

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Élaboration de VTR chronique par voie respiratoire pour le tétrachlorure de carbone

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

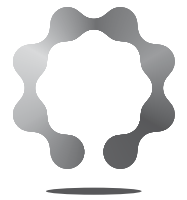
Décembre 2017

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Élaboration de VTR chronique par voie respiratoire pour le tétrachlorure de carbone

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Décembre 2017

Édition scientifique

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 22 décembre 2017

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

relatif à l'élaboration de VTR chronique par voie respiratoire
pour le tétrachlorure de carbone (CAS n°56-23-5)

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 22 juillet 2016 par la Direction générale de la santé pour la détermination de valeurs sanitaires pour le tétrachlorure de carbone dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans l'air intérieur (Bas-Rhin).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Agence régionale de santé (ARS) Alsace Champagne Ardennes Lorraine a été sollicitée concernant la présence de tétrachlorure de carbone (CCl₄) dans l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) et dans l'air intérieur de logements dans le département du Bas-Rhin, faisant suite au renversement d'un camion-citerne sur la commune de Benfeld en 1970.

S'agissant de l'exposition de la population au CCl₄ par inhalation, des prélèvements d'air ont été réalisés en 2005 à l'intérieur de logements situés sur la commune de Benfeld aux environs de la zone de déversement. Les concentrations maximales mesurées étaient à l'époque de l'ordre de 1,6 µg/m³. La collectivité envisage de faire réaliser de nouvelles mesures dans l'air intérieur.

Dans ce contexte, du fait de l'existence de plusieurs valeurs toxicologiques de référence (VTR) par inhalation dans la littérature scientifique et afin de pouvoir proposer le cas échéant des mesures de gestion adaptées, il est demandé à l'Anses de déterminer une VTR chronique par inhalation.

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

VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérigènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2015a).

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

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

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

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » (appelé ci-après CES « Substances »). Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre décembre 2016 et juin 2017. Ils ont été adoptés par le CES « Substances » réuni le 22 juin 2017.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Synthèse des effets sur la santé

3.1.1. Effets aigus

Chez l'Homme, les principaux effets observés sont une dépression du système nerveux central, des troubles hépatiques évoluant vers une insuffisance hépatique et des lésions rénales pouvant évoluer vers une tubulopathie réversible. Ces effets sont observés indépendamment de la voie d'exposition. Toutefois, l'inhalation est la voie d'exposition principale incriminée dans les intoxications ou accidents rapportés dans la littérature. Lors d'intoxications accidentelles ou volontaires par voie orale, des irritations gastriques ont également été rapportées. Par voie cutanée, le CCl₄ entraîne la formation d'érythèmes transitoires.

Chez l'animal, par inhalation, les effets observés sont surtout hépatiques (augmentation des activités enzymatiques, stéatoses).

3.1.1.Effets chroniques non cancérogènes

Chez l'Homme, des études conduites en milieu professionnel rapportent des manifestations hépatiques (augmentation des transaminases) et des troubles neurologiques (céphalées, étourdissements, nausées). Certaines études rapportent une toxicité hépatique et rénale potentialisée par la consommation d'alcool (INERIS, 2005).

Chez l'animal (rat, souris et chien), des atteintes hépatiques ont été observées par voies orale et inhalée : augmentation du poids du foie, augmentation des paramètres biochimiques hépatiques, cirrhose, fibrose et nécrose. Une vacuolisation centrolobulaire est également observée, en cohérence avec la localisation des cytochromes P (CYP) 2E1, principales enzymes du métabolisme du CCl₄. L'hépatotoxicité se manifeste chez le rat et la souris à des concentrations de 10 ppm (64 mg.m⁻³) et la sévérité des effets augmente avec la dose.

Nagano *et al.* ont publié, en 2007b, une étude de toxicité sur 13 semaines (90 jours) chez le rat F344 et la souris BDF1, des deux sexes. Les animaux ont été exposés 6 h/j, 5 j/7 selon 5 groupes de doses : 0, 10, 30, 90, 270, 810 ppm. Les auteurs ont recherché les lésions hépatiques et rénales, les modifications des paramètres hématologiques. Un suivi du poids (absolu et relatif) des organes a également été réalisé.

Les auteurs n'ont pas détecté de lésions des voies aériennes supérieures (cavité nasale, larynx, trachée, poumons). Les résultats histologiques montrent l'inclusion de larges gouttelettes lipidiques dans les cellules hépatiques (rats des deux sexes et souris mâles) et de globules cytoplasmiques (souris) ainsi qu'un relargage d'enzymes de cytolysse hépatique à partir de 10 ppm. Des phénomènes de fibrose et de cirrhose ont été observés uniquement chez le rat à 270 ppm. Un phénomène de collapsus hépatique avec nécrose a été observé chez la souris à partir de 30 ppm. Le suivi biochimique montre des signes de néphrotoxicité chez le rat et une hématotoxicité (anémie) chez les deux espèces animales testées, à partir de 90 ppm.

3.1.1.Effets cancérogènes

Chez l'Homme, par voie orale, aucune étude n'est disponible. Par voie inhalée, de nombreuses études ont été conduites en milieu professionnel afin d'évaluer une relation possible entre l'augmentation d'incidence des cancers ou de la mortalité par cancer et l'exposition au CCl₄.

Le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le CCl₄ en « 2B » (peut être cancérogène pour l'Homme) (CIRC, 1999) basé sur des preuves insuffisantes chez l'Homme et suffisantes chez l'animal.

Chez l'animal, par voies orale et inhalée, les études expérimentales (rats, hamsters et souris) ont apporté des preuves convaincantes concernant la relation entre l'exposition par voie orale au CCl₄ et le risque de cancer du foie (INERIS, 2007).

Par gavage, les études de cancérogenèse du NTP¹ montrent :

- chez la souris (B6C3F1, mâle et femelle), des hépatocarcinomes et des phéochromocytomes,
- chez le rat (Osborne Mendel, mâle et femelle), aucun cancer observé aux doses testées mais des signes de toxicité hépatique : hyperplasie, cirrhose, inclusions graisseuses et nodules régénératifs.

¹ National Toxicology Program

Nagano *et al.* (2007a) ont réalisé une étude de cancérogénèse par inhalation chez 50 rats femelles et 50 rats mâles F344 et 50 souris femelles et 50 souris mâles BDF1, exposés 6 h/j, 5 jour par semaine pendant 104 semaines. Chez les souris, une diminution significative de la survie a été notée aux doses de 25 et 125 ppm. Des modifications de certains paramètres hématologiques et biochimiques sanguins, dont les enzymes hépatiques, et dans l'analyse d'urine ont été observés aux deux plus fortes doses. Chez les souris mâles, des changements hépatiques, des kystes et une dégénérescence hépatique, ont été notés aux doses de 25 et 125 ppm. Dans la rate, une augmentation des dépôts d'hémosidérine à la dose de 25 ppm, et une hématopoïèse extramédullaire ont été observées à 125 ppm. Chez les souris femelles, les changements hépatiques comprenaient des dépôts de céroïde, des thrombus, une nécrose, une dégénérescence et des kystes aux doses de 25 et 125 ppm. À la dose de 25 ppm, une augmentation des dépôts d'hémosidérine dans la rate a été observée,

L'incidence d'adénomes hépatocellulaires était significativement accrue aux doses de 25 et 125 ppm chez les souris mâles et de 5 et 25 ppm chez les souris femelles. L'incidence des carcinomes hépatocellulaires était significativement augmentée aux doses de 25 et de 125 ppm chez les souris mâles et femelles. L'incidence des phéochromocytomes des surrénales est quant à elle plus élevée chez les souris mâles aux doses de 25 et 125 ppm et chez les souris femelles à la dose de 125 ppm.

3.1.2. Génotoxicité

Plus de 80 études sur la génotoxicité du CCl₄ ont été publiées, l'ensemble des tableaux de résultats compilés par l'US EPA (2010) a été utilisé pour réaliser une étude globale de pondération des études en fonction de la pertinence des résultats en utilisant la trame proposée par l'ECHA (2015) (évaluation des poids des preuves).

L'examen critique de l'ensemble des données amène à la conclusion que le CCl₄ n'agit probablement pas selon un mode d'action génotoxique direct et que les dommages oxydatifs à l'ADN sont plutôt indirects/secondaires aux phénomènes de lipopéroxydation.

Le mode d'action de la cancérogénèse hépatique n'est pas encore bien établi. L'hypothèse du métabolisme du CCl₄ par le CYP 2E1 en un radical trichlorométhyl et autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les produits de la peroxydation lipidique conduisent à une cytotoxicité soutenue et d'une prolifération par régénération cellulaire est proposée comme mode d'action.

Le CES « Substances » considère le CCl₄ comme une substance cancérogène à seuil (génotoxicité indirecte).

3.2. Élaboration d'une VTR chronique par inhalation

3.2.1. Choix de l'effet critique

Le CES considère parmi les effets du CCl₄ que l'effet cancérogène hépatique est l'effet sanitaire le plus sensible. Parmi les effets chroniques et cancérogènes rapportés, l'augmentation des adénomes et carcinomes hépatiques chez le rat et la souris sont décrits comme les effets les plus sensibles, survenant aux plus faibles niveaux d'exposition. Ces effets sont donc retenus comme effet critique.

3.2.2. Analyse des VTR existantes

Parmi les VTR chroniques existantes (tableaux ci-dessous), le CES « Substances » estime qu'aucune de ces valeurs ne peut être retenue en raison du choix de l'effet critique (jugé non

pertinent, effets sans seuil) et/ou du choix d'une étude clé jugée de qualité insuffisante. Ainsi, les experts du CES proposent de construire une VTR chronique par inhalation.

Tableau 1 : VTR à seuil disponibles pour des expositions chroniques par inhalation

Organisme	VTR chronique à seuil			
	RIVM	ATSDR	OEHHA	US EPA
Année	2001	2005	2000	2010
VTR	VTR	MRL*	REL*	RfC*
Valeur VTR	60 µg.m ⁻³	180 µg.m ⁻³	40 µg.m ⁻³	100 µg.m ⁻³
Effet critique	Effets hépatiques	Augmentation du poids du foie, modifications histologiques et biochimiques	Augmentation du poids du foie, modifications histologiques	Modification graisseuses au niveau hépatique
Espèce	Rat	Rat	Cobaye	Rat
Voie d'exposition	Inhalation	Inhalation	Inhalation	Inhalation
Dose critique	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	BMC _{10%} L _{95%} HEC = 14.3 mg.m ⁻³ basée sur l'utilisation d'un modèle PBPK
Ajustements	NOAEC _{ADJ} = 6,4 mg.m ⁻³	NOAEC _{ADJ} = 5,4 mg.m ⁻³	NOAEC _{ADJ} = 5,4 mg.m ⁻³ NOAEC _{HEC} = 10,2 mg.m ⁻³	
UF	100 UF _A = 10 UF _H = 10	30 UF _A = 3 UF _H = 10	300 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 3 UF _S = 3	100 UF _{A-TD} = 3 UF _H = 10 UF _D = 3
Référence	source non communiquée, Adams <i>et al.</i> , 1952	Adams <i>et al.</i> , 1952	Adams <i>et al.</i> , 1952	Nagano <i>et al.</i> , 2007 a

* MRL : Minimum Risk Level ; REL : Reference Exposure Level ; RfC : Reference Concentration

Tableau 2 : VTR sans seuil disponibles pour des expositions chroniques par inhalation

Organisme	OEHHA	US EPA
Année	2000	2010
VTR	ERU _i *	ERU _i
Valeur VTR	4,2.10 ⁻⁵ (µg.m ⁻³) ⁻¹	6.10 ⁻⁶ (µg.m ⁻³) ⁻¹
Effet critique	Augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques (carcinomes hépatocellulaires et hépatomes)	Augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques (carcinomes hépatocellulaires et hépatomes)
Espèce	Hamster, souris	Souris
Voie d'exposition	Inhalation	Inhalation
Construction	Extrapolation voie à voie	Extrapolation linéaire à l'origine
Référence	Della Porta <i>et al.</i> , 1961; Edwards <i>et al.</i> , 1942	Nagano <i>et al.</i> , 2007 a

* ERU_i : Excès de Risque Unitaire par inhalation

3.2.3. Choix de l'étude clé

Les experts du CES retiennent l'étude de Nagano *et al.* (2007a) comme étude clé. Nagano *et al.* (2007a) ont réalisé une étude de cancérogenèse par inhalation chez 50 femelles et 50 rats F344 et souris BDF1, 6 h par jour, 5 jours par semaine pendant 104 semaines. Les auteurs ont mis en évidence :

- chez la souris (BDF1, mâle et femelle), des adénomes et carcinomes hépatiques et des phéochromocytomes, à partir de 5 ppm
- chez le rat (F344, mâle et femelle), des adénomes et carcinomes hépatiques, à partir de 125 ppm.

3.2.4. Choix de la concentration critique

La relation entre l'augmentation des adénomes et carcinomes hépatique chez la souris et la concentration journalière d'exposition au CCL₄ a été modélisée avec le logiciel BMDS 2.1.1 de l'US EPA : élaboration d'une Benchmark Dose (BMD). Les concentrations critiques calculées sont :

$$\text{BMD}_{10\%} = 4,2 \text{ ppm et } \text{BMD}_{10\%} \text{ L}_{95\%} = 2,6 \text{ ppm}$$

3.2.5. Ajustements temporel et allométrique

Les animaux ont été exposés 6 heures par jour et 5 jours par semaine. Pour tenir compte de la discontinuité de l'exposition, un ajustement temporel a été effectué

$$\text{BMDL}_{\text{ADJ}} = 2,6 \text{ ppm} \times 6/24 \times 5/7 = 0,46 \text{ ppm} = 2,91 \text{ mg.m}^{-3}$$

D'après les recommandations de l'US EPA (1994), le CCl₄ est considérée comme un gaz avec une action systémique. Ainsi, l'ajustement dosimétrique appliqué par défaut est la suivante :

$$\text{concentration critique}_{\text{Homme}} = \text{concentration critique}_{\text{animale}} \times (\text{Hb/g})_{\text{animal}} / (\text{Hb/g})_{\text{Homme}}$$

Avec (Hb/g) : coefficient de partage sang/air

Les coefficients de partage sang/air du CCl₄ pour l'Homme et le rat n'étant pas connus, l'US EPA propose de retenir la valeur par défaut de 1 (US EPA, 1994).

3.2.6. Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de CCl₄ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une concentration équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'OMS/IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 1 car il s'agit d'une étude de 104 semaines
- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL/C ou d'un NOAEL/C ($UF_{B/L}$) : 1 car la relation dose réponse a permis de déterminer une benchmark dose.

Insuffisance des données (UF_D) : 1 car il existe existait de nombreuses études sur le CCl_4 .

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

3.2.7. Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données : **Fort.**

L'analyse bibliographique a révélé qu'il existait de nombreuses études sur le CCl_4 .

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **Moyen.**

L'effet est bien décrit par les auteurs, et retrouvé dans d'autres publications. Cependant, cet effet n'a pas été confirmé chez l'Homme.

- Niveau de confiance dans choix de l'étude clé : **Fort.**

Il s'agit d'une étude bien détaillée qui suit les lignes directrice.

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **Fort.**

Une BMD a pu être construite.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc moyen-fort.

3.2.8. Proposition de VTR chronique par inhalation

Une VTR chronique par voie inhalation est proposée pour le tétrachlorure de carbone basée sur les adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez la souris. Un niveau de confiance moyen-fort a été attribué à cette VTR.

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR chronique par inhalation
adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez la souris Nagano <i>et al.</i> (2007a)	$BMD_{10\%L_{95\%}} = 2,6 \text{ ppm}$	25 $UF_A = 2,5$ $UF_H = 10$	VTR = 0,11 $mg.m^{-3}$ (soit 0,0184 ppm)
	<u>Ajustement temporel</u> $BMDL_{ADJ} = 2,6 \text{ ppm} \times 6/24 \times 5/7 = 0,46 \text{ ppm} = 2,91 \text{ mg.m}^{-3}$		Niveau de confiance Moyen-fort

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du CES « Substances » qui portent sur l'élaboration de VTR chronique par inhalation pour le tétrachlorure de carbone.

En 2009, l'Anses (Afsset, 2009) avait élaboré une VTR chronique à seuil par voie respiratoire pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone. Les signes d'une cytotoxicité hépatique avaient été retenus comme effet critique précurseur des effets cancérigènes. A partir de l'étude de toxicité subchronique 13 semaines chez le rat et la souris (Nagano *et al.*, 2007), les experts avaient choisi une concentration critique associée de 10 ppm (LOAEC). Cette VTR n'est désormais plus conforme à la méthodologie de construction des VTR (Anses, 2017), et a donc été révisée pour tenir compte de :

- l'application du facteur **UF_A** (variabilité inter-espèces). Un facteur de 10 avait été retenu en 2009. Selon la méthodologie de construction des VTR, il est préconisé de réaliser un ajustement dosimétrique, dont la valeur par défaut est de 1 (UF_{A-TK}). Pour tenir compte des incertitudes résiduelles sur la toxicodynamie, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 (UF_{A-TD}) selon les recommandations de l'OMS/IPCS (OMS-IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses ;
- l'évolution au cours de ces dernières années quant aux choix de la dose/concentration critique pouvant être utilisée comme point de départ (POD), une benchmark dose a été calculé (BMD_{10%L95%} = 2,6 ppm) sur la base de l'effet cancérigène. Elle est plus faible que celle qui avait été déterminée sur la cytotoxicité hépatique (LOAEC = 10 ppm).

La VTR chronique par inhalation du CCl₄ est décrite dans le tableau ci-dessous.

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR chronique par inhalation
adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez la souris Nagano <i>et al.</i> (2007a)	BMD _{10%L95%} = 2,6 ppm	25 UF _A = 2,5 UF _H = 10	VTR = 0,11 mg.m⁻³ (soit 0,0184 ppm)
	<u>Ajustement temporel</u> BMDL _{ADJ} = 2,6 ppm x 6/24 x 5/7 = 0,46 ppm = 2,91 mg.m ⁻³		Niveau de confiance Moyen-fort

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

Valeur toxicologique de référence, VTR, tétrachlorure de carbone, chronique, inhalation

BIBLIOGRAPHIE

Adams EM, Spencer HC, Rowe VK, McCollister DD, Irish DD. (1952) Vapor toxicity of carbon tetrachloride determined by experiments on laboratory animals. *Arch Ind Hyg Occup Med*, 6:50-66.

ATSDR. (2005) Toxicological profile for carbon tetrachloride. U.S. Department of health and human services. Public health service.

Benson JM, Tibbetts BM, Thrall KD et al. (2001) Uptake, tissue distribution, and fate of inhaled carbon tetrachloride: comparison of rat, mouse, and hamster. *Inhal Toxicol* 13:207–217.

David A, Frantik E, Holusa E, Novakova O. (1981) Role of time and concentrations on carbon tetrachloride toxicity in rats. *Int Arch Occup Environ Health*. 48(1):49-60.

INERIS. (2005) Tétrachlorure de carbone. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.

INERIS. (2007) Rapport d'étude n° 06CR072. Analyse et construction des VTR pour le 1,2-dichloroéthane, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le chlorure de méthylène.

Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. (2007) Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. Jul-Sep;25(3):185-209.

Marchand C, McLean S et Plaa GL. (1970). The effect of SKF 525A on the distribution of carbon tetrachloride in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 174 : 232–238.

Nagano K, Nishizawa T, Yamamoto S, Matsushima T. (2007a) Inhalation carcinogenesis studies of six halogenated hydrocarbons in rats and mice. *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases*, Elsevier Science B.V., pp 741-746.

Nagano K, Umeda Y, Saito M, Nishizawa T, Ikawa N, Arito H, Yamamoto S et Fukushima S. (2007b) Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Occup Health* 2007;49:249-259

OEHHA (Office of environmental health hazard assessment). Determination of noncancer chronic reference exposure levels. Chronic toxicity summary. Carbon tetrachloride. Décembre 2000.

Paul BB et Rubinstein D. (1963). Metabolism of carbon tetrachloride and chloroform by the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 141: 141–148.

Paustenbach DJ, Carlson GP, Christian JE et Born GS. (1986) A comparative study of the pharmacokinetics of carbon tetrachloride in the rat following repeated inhalation exposures of eight and 11.5 h/day. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 6: 484–497.

RIVM. (2001) Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. RIVM report 711701 025. Mars 2001.

Sanzgiri UY, Kim HJ, Muralidhara S, Dallas CE et Bruckner JV. (1995) Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics et acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134: 148–154.

Sanzgiri UY, Srivatsan V, Muralidhara S, Dallas CE et Bruckner JV (1997). Uptake, distribution, elimination of carbon tetrachloride in rat tissue following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143 : 120–129.

US EPA. (2010) Toxicological review of carbon tetrachloride.

WHO (2010) Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

**Elaboration de VTR chronique par voie respiratoire
pour le tétrachlorure de carbone (CAS n°56-23-5)**

**Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »
Saisine «2016-SA-0162»**

RAPPORT

d'expertise collective actualisé

Comité d'experts spécialisé
**« Caractérisation des dangers des substances
et valeurs toxicologiques de référence »**

Juin 2017

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, tétrachlorure de carbone, chronique, inhalation

Key words

Toxicological Reference Value, TRV, carbon tetrachloride, chronic, inhalation route

Présentation des intervenants

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

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

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

- CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » – 12 janvier, 23 février, 11 mai et 22 juin 2017

Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

Vice-président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP

M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR

Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire

M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies de CIRC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au CEA, Centre de Cadarache. Docteur es science – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Pharmacien toxicologue, ERT, retraité de l'INRS

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

INERIS RAPPORTEURS

Mme Fatiha EL-GHISSASSi – Scientifique, Section des Monographies de CIRC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

M. Fabrice NESSLANY- Chef du Service Toxicologie- Laboratoire de Toxicologie Génétique- Institut Pasteur de Lille.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

M. Laurent BODIN - Chef de projets scientifiques

Mme Aurélie Mathieu-Huart - Cheffe de projets scientifiques

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses



SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Liste des tableaux	9
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	10
1.1 Contexte	10
1.2 Objet de la saisine	10
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	11
1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt.....	11
2 Informations générales.....	12
2.1 Identification de la substance	12
2.2 Propriétés physico-chimiques	12
2.3 Sources et utilisations	13
3 Synthèse des données toxicologiques.....	14
3.1 Toxicocinétique	14
3.1.1 Absorption.....	14
3.1.2 Distribution.....	14
3.1.3 Métabolisme.....	14
3.1.4 Excrétion.....	15
3.2 Toxicité aiguë.....	15
3.3 Toxicité subchronique et chronique.....	15
3.3.1 Données chez l'Homme.....	15
3.3.2 Données chez l'animal.....	15
3.4 Effets sur la reproduction et le développement	16
3.4.1 Données chez l'Homme.....	16
3.4.2 Données chez l'animal.....	17
3.5 Génotoxicité.....	17
3.6 Cancérogénicité.....	19
3.7 Mécanismes d'action	22
3.8 Extrapolation de l'animal à l'Homme.....	22

4	Recueil des valeurs toxicologiques de référence	23
5	Proposition de VTR chronique par voie inhalation	25
5.1	Choix de l'effet critique et de l'hypothèse de construction	25
5.2	Analyse des VTR existantes	25
5.3	Construction de VTR	26
5.3.1	Choix de l'étude clé	26
5.3.2	Choix de la dose critique	27
5.3.3	Ajustement temporel	28
5.3.4	Ajustement dosimétrique	29
5.3.5	Choix des facteurs d'incertitudes	29
5.3.6	Proposition de VTR chronique par voie respiratoire	30
5.3.7	Niveau de confiance	31
6	Conclusions du CES	32
7	Bibliographie	33
	ANNEXES	35
	Annexe 1 : Lettre de saisine	36
	Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport	38
	Annexe 3 : Evaluation du mode d'action génotoxique (direct ou indirect) du tétrachlorure de carbone (CCl₄)	39

Sigles et abréviations

Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
BMR	Benchmark Response
CES	Comité d'Experts Spécialisés
ERS	Evaluation de Risques Sanitaires
HEC	Concentration équivalent humaine (= Human Equivalent Concentration)
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
MRL	Minimal Risk Level
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NTP	National Toxicology Program
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment (Californie - États-Unis)
RfC	Reference Concentration
SD	Standard Deviation
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
UF	Facteur d'incertitude (= Uncertainty Factor)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _D	Facteur d'incertitude au manque de données
UF _H	Facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TK}	Composante toxicocinétique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TD}	Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _L	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
UF _S	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
US EPA	United States Environmental Protection Agency (États-Unis)
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
WoE	Weight of Evidence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification du tétrachlorure de carbone	12
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du tétrachlorure de carbone	12
Tableau 3 : Contexte d'exposition humaine du tétrachlorure de carbone.....	13
Tableau 4 : Résultats de l'étude de toxicité sur 13 semaines (Nagano <i>et al.</i> , 2007b).....	16
Tableau 5 : Incidence des tumeurs chez la souris (Nagano <i>et al.</i> 2007a)	21
Tableau 6 : Incidence des tumeurs chez le rat (Nagano <i>et al.</i> 2007a).....	21
Tableau 7 : VTR disponibles pour des expositions subchronique/chronique par inhalation.....	23
Tableau 8: VTR sans seuil disponibles pour des expositions chroniques par inhalation	24
Tableau 9 : Résumé de l'augmentation de tumeurs chez les femelles BDF1	28
Tableau 10 : VTR chronique par voie respiratoire pour le tétrachlorure de carbone	32

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Afsset, 2010).

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

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

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

1.2 Objet de la saisine

L'Anses a été saisie le 22 juillet 2016 par la Direction générale de la santé pour la détermination de valeurs sanitaires pour le tétrachlorure de carbone dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans l'air intérieur (Bas-Rhin).

L'Agence régionale de santé (ARS) Alsace Champagne Ardennes Lorraine a été sollicitée concernant la présence de tétrachlorure de carbone dans l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) et dans l'air intérieur de logements dans le département du Bas-Rhin faisant suite au renversement d'un camion citerne sur la commune de Benfeld en 1970.

S'agissant de l'exposition de la population au tétrachlorure de carbone par inhalation, des prélèvements d'air ont été réalisés en 2005 à l'intérieur de logements situés sur la commune

de Benfeld aux environs de la zone de déversement. Les concentrations maximales mesurées étaient à l'époque de l'ordre de 1,6 µg.m⁻³. La collectivité envisage de faire réaliser de nouvelles mesures dans l'air intérieur.

Dans ce contexte, du fait de l'existence de plusieurs VTR par inhalation dans la littérature et afin de pouvoir proposer des mesures de gestion adaptées le cas échéant, il est demandé de déterminer une VTR chronique par inhalation.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise des rapporteurs ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport produit tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) »

1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

2 Informations générales

2.1 Identification de la substance

Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est un composé chimique comportant 4 atomes de chlore. Son identification est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Identification du tétrachlorure de carbone

Numéro CAS	56-23-5
Numéro CE	200-262-8
Nom	Tétrachlorure de carbone
Synonymes	Fr : perchlorométhane, tétrachlorométhane US : carbon chloride, carbon tetrachloride, methane tetrachloride, tetrachloromethane, perchloromethane, tetrachlorocarbon, benzinofom, Carbona, Freon 10, Halon 104, Tetraform
Formule brute	CCl ₄
Formule développée	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array}$
Appartenance à une liste de substances classées pour leur potentiel cancérigène	CIRC (1999) : 2B " <i>possibly carcinogenic to humans</i> " NTP : R " <i>reasonably anticipated to be a human carcinogen</i> " US EPA : B2 " <i>probable human carcinogen</i> "

2.2 Propriétés physico-chimiques

Le tétrachlorure de carbone est un liquide incolore très volatil dont les principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du tétrachlorure de carbone

Forme physique	Liquide, incolore, très volatil Odeur forte d'éther
Poids moléculaire	153,8 g/mol
Point d'ébullition	76-77°C (à pression normale)
Pression de vapeur	12050 Pa à 20°C (11940-12172) 15190 Pa à 25°C (15065-15332)
Densité	Liquide : 1,593-1,595 Vapeur : 5,3
Facteurs de conversion	1 ppm = 6,39 mg.m ⁻³
Solubilité	800 mg/L à 20°C

	1160 mg/L à 25°C
LogKow ¹ , Koc ²	2,67 ; 71 L/kg
Produits de dégradation environnementale	Eaux de surface : biodégradation presque nulle (INERIS, 2005) Milieu anaérobie : CO ₂ (INERIS, 2005)

2.3 Sources et utilisations

En raison de sa très grande volatilité, l'Homme est exposé au tétrachlorure de carbone par voie inhalée. Des éléments d'information sur le contexte d'exposition sont résumés dans le Tableau 3

Tableau 3 : Contexte d'exposition humaine du tétrachlorure de carbone

Types d'utilisation	Fluides propulseurs, solvants dans la fabrication des plastiques et résines. Employé dans la synthèse des nylons. Employé comme solvant et agent nettoyant pour les machines
Restrictions d'usage	Usages industriels en déclin depuis 1987 par le protocole de Montréal et de ses amendements réglementant l'utilisation des substances qui appauvrissent la couche d'ozone.
Milieux de rejet dans l'environnement	Air : 97% (origine : production et utilisation, formation secondaire) → tension de vapeur élevée. Concentration : 0,5 à 1 µg.m ⁻³ (INERIS, 2005) Sols : 2% Eau : < 1%

Sources : ATSDR, 2005; INERIS, 2005; OEHHA, 2000; RIVM, 2001 ; Office of Chemical Safety and Pollution Prevention U.S. EPA Preliminary Information on Manufacturing, Processing, February 2017 Distribution, Use, and Disposal: Carbon Tetrachloride

¹ Log Kow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans les solvants organiques et les lipides dans les membranes biologiques et reflète indirectement les potentiels de bioaccumulation et de bioconcentration d'une substance.

² Koc : coefficient d'absorption sur la matière organique. C'est le ratio entre la quantité de substance adsorbée par le sol par unité de poids de carbone organique et la concentration de la substance en solution, à l'équilibre. Il reflète donc la mobilité de la substance dans les sols.

3 Synthèse des données toxicologiques

3.1 Toxicocinétique

On dispose de très peu de données toxicocinétiques chez l'Homme. L'ensemble des données de toxicocinétique proviennent des études chez l'animal.

3.1.1 Absorption

Chez l'animal, l'absorption par voie orale se situe principalement au niveau intestinal. Elle est rapide et peut être augmentée par l'alimentation (alcool ou graisses) (INERIS, 2005). Chez des rats, 80 à 86 % de la dose administrée oralement de tétrachlorure est excrétée dans l'air expiré dans les 10 à 18 h (Paul et Rubinstein, 1963 ; Marchand *et al.*, 1970).

Par inhalation, une absorption rapide a été observée chez des rats exposés à une concentration de 100 ou 1000 ppm pendant 2 h (Sanzgiri *et al.*, 1995). Chez des rats, des souris et des hamsters, après l'exposition pendant 4 h à des vapeurs de CCl₄ à une concentration de 20 ppm, les concentrations sanguines du tétrachlorure marqué au ¹⁴C étaient respectivement à 12,1, 1,97 et 3,65 µmol (Benson *et al.*, 2001).

3.1.2 Distribution

Du fait de ses propriétés lipophiles, le CCl₄ s'accumule dans les tissus riches en graisse (tissu adipeux, foie, moelle osseuse) (INERIS, 2005).

Le CCl₄ est distribué dans tous les principaux organes, les plus fortes concentrations étant observées dans les tissus graisseux, le foie, le rein, le cerveau, le poumon, la moelle osseuse et les surrénales (Marchand *et al.*, 1970 ; Paustenbach *et al.*, 1986 ; Sanzgiri *et al.*, 1997 ; Benson *et al.*, 2001).

Dans l'étude de Sanzgiri *et al.* (1997), les auteurs ont comparé l'absorption et la distribution du CCl₄ administré à des rats par inhalation, intubation gastrique et bolus oral. Pour les trois formes d'administration, les concentrations de CCl₄ dans les graisses devenaient plus élevées que dans les autres tissus et s'accumulaient.

3.1.3 Métabolisme

Environ 50% du CCl₄ est métabolisée (la part restante est éliminée sous forme inchangée). Il est transformé majoritairement par le cytochrome P450 (CYP) 2E1 pour former un radical trichlorométhyl (CCl₃*). Ce radical peut se fixer notamment aux lipides altérant ainsi leur métabolisme ou former des adduits à l'ADN.

3.1.4 Excrétion

Le CCl₄ est excrété principalement dans l'air expiré, les fèces et l'urine. L'excrétion du CCl₄ et de ses métabolites peut varier selon l'espèce, la dose et la voie d'exposition. Benson *et al.* (2001) ont fait inhaler pendant 4 h à des rats, des souris et des hamsters des vapeurs de CCl₄ marqué au ¹⁴C à une concentration de 20 ppm. Dans les 48 h suivant l'exposition, 65 à 83 % du CCl₄ avaient été éliminés dans l'air expiré sous forme de dioxyde de carbone.

3.2 Toxicité aiguë

Chez l'Homme, les principaux effets observés sont une dépression du système nerveux central, des troubles hépatiques évoluant vers une insuffisance hépatique et des lésions rénales pouvant évoluer vers une tubulopathie réversible. Ces effets sont observés indépendamment de la voie d'exposition. Toutefois, l'inhalation est la voie d'exposition principale incriminée dans les intoxications ou accidents rapportés dans la littérature. Lors d'intoxications accidentelles ou volontaires par voie orale, des irritations gastriques ont également été rapportées. Par voie cutanée, le CCl₄ entraîne la formation d'érythèmes transitoires.

Chez l'animal, par inhalation, les effets observés sont surtout hépatiques (augmentation des activités enzymatiques, stéatoses).

3.3 Toxicité subchronique et chronique

3.3.1 Données chez l'Homme

Chez l'Homme, des études conduites en milieu professionnel rapportent des manifestations hépatiques (augmentation des transaminases) et des troubles neurologiques (céphalées, étourdissements, nausées). Certaines études rapportent une toxicité hépatique et rénale potentialisée par la consommation d'alcool (INERIS, 2005).

3.3.2 Données chez l'animal

Chez l'animal (rat, souris et chien), des atteintes hépatiques ont été observées par voies orale et inhalée : augmentation du poids du foie, augmentation des paramètres biochimiques hépatiques, cirrhose, fibroses et nécroses. Une vacuolisation centrolobulaire est également observée, en cohérence avec la localisation des CYP 2E1, principales enzymes du métabolisme du CCl₄. L'hépatotoxicité se manifeste chez le rat et la souris à des concentrations de 10 ppm (64 mg.m⁻³) et la sévérité des effets augmente avec la dose. Adams *et al.* (1952) rapportent qu'à la dose de 5 ppm, aucun effet n'est rapporté chez le rat.

Nagano *et al.* ont publié, en 2007 b, une étude de toxicité sur 13 semaines (90 jours) chez le rat F344 et la souris BDF1, des deux sexes. Les animaux ont été exposés 6 h/j, 5 j/7 selon 5 groupes de doses : 0, 10, 30, 90, 270, 810 ppm. Les auteurs ont recherché les lésions hépatiques et rénales, les modifications des paramètres hématologiques. Un suivi du poids des organes a également été réalisé (absolu et relatif). En prime, les auteurs ont recherché

un marqueur primitif de tumeur pour les rats mâles à 810 ppm (foyers d'altération cellulaire hépatique révélés par une glutathion-transférase de type primitif / placentaire – GST-P).

Les auteurs n'ont pas détecté de lésions des voies aériennes supérieures (cavité nasale, larynx, trachée, poumons). Les résultats histologiques montrent l'inclusion de larges gouttelettes dans les cellules hépatiques (rats des 2 sexes et souris mâles) et de globules cytoplasmiques (souris) ainsi qu'un relargage d'enzymes de cytolysse hépatique à partir de 10 ppm (Tableau 4). Des phénomènes de fibrose et de cirrhose ont été observés uniquement chez le rat à 270 ppm. Un phénomène de *collapsus hépatique* avec nécrose a été observé chez la souris. Le suivi biochimique montre des signes de néphrotoxicité chez le rat et une hématotoxicité (anémie) chez les deux espèces animales testées, à partir de 90 ppm.

Tableau 4 : Résultats de l'étude de toxicité sur 13 semaines (Nagano *et al.*, 2007b)

Group (ppm)	Male						Female					
	Control	10	30	90	270	810	Control	10	30	90	270	810
Number of animals examined	9 *	9*	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Liver												
Cytoplasmic globules	0	5** (1.0)	10** (1.0)	10** (2.0)	10** (2.0)	10** (2.0)	0	0	10** (1.0)	10** (2.0)	10** (2.0)	10** (2.0)
Fatty change: small droplet	9 (1.0)	2 (1.0)	0	0	0	0	5 (1.0)	4 (1.0)	1 (1.0)	0	0	0
Fatty change: large droplet	0	4* (1.0)	7** (1.1)	8** (1.0)	0	0	0	0	4* (1.0)	3 (1.0)	3 (1.0)	1 (1.0)
Collapse	0	0	9** (1.0)	10** (1.0)	10** (2.0)	10** (2.0)	0	0	10** (1.0)	9** (1.0)	10** (2.0)	10** (2.0)
Nuclear enlargement with atypia	0	0	0	0	9**	10**	0	0	0	0	10**	10**
Altered cell foci	0	0	0	0	5**	7**	0	0	0	0	2	0
Acidophilic cell foci	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Basophilic cell foci	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0
Clear cell foci	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	1	0
Mixed cell foci	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

Values indicate number of animals bearing lesion. The values in parentheses indicate the average of severity grade index of the lesion. The average of severity grade was calculated with the following equation. $\Sigma (\text{grade} \times \text{number of animals with grade}) / \text{number of affected animals}$. Grade: 1=slight, 2=moderate, 3=severe. Significant difference; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ by Chi-square test. *: One mouse died of hydronephrosis.

Adams *et al.* (1952) ont exposé des rats par inhalation à 5, 10, 25, 50, 100, 200 et 400 ppm (32, 64, 160, 320, 630, 1282 et 2520 mg.m⁻³), pendant 7 h/j, 5 j/semaine pendant 6 à 7 mois. Des cirrhoses sont observées pour des expositions de 100 ppm (630 mg.m⁻³). L'hépatotoxicité apparaît dès 10 ppm : augmentation du poids du foie, du taux de lipides et de cholestérol estérifié. Cette étude retient comme NOAEC la concentration de 5 ppm à laquelle aucune toxicité n'est décrite.

3.4 Effets sur la reproduction et le développement

3.4.1 Données chez l'Homme

Chez l'Homme, il n'existe pas de données disponibles.

3.4.2 Données chez l'animal

Chez l'animal, deux études par administration intra-péritonéale de 2378 mg/kg/pc chez le rat ont mis en évidence des effets sur le système de reproduction une dizaine de jours après l'injection (atrophie testiculaire et ovarienne). Mais les effets observés par ce mode d'administration ne sont pas facilement transposables aux conditions d'exposition humaine. Les études sur le développement ne permettent pas d'écarter l'hypothèse d'une toxicité maternelle (INERIS, 2005).

3.5 Génotoxicité

Le CCl₄ est métabolisé essentiellement par le foie mais aussi par les reins, les poumons et autres tissus contenant des CYP.

Le CCl₄ est activé par le CYP2E1 (et le CYP 3A) à fortes doses en un intermédiaire le radical CCl₃. trichlorométhyl qui va se transformer en chloroforme ou interagir avec des macromolécules (protéines et ADN pour former des adduits). Les métabolites du CCl₄ sont le chloroforme (CHCl₃), le CO, CO₂, hexachloroéthène et le phosgène (chlorure de carbonyle COCl₂). Selon les conditions aérobies ou anaérobies, le métabolisme du CCl₄ va s'orienter différemment (voie du trichlorométhyl peroxy radical CCl₃O₂· en aérobie ; voie du chloroforme, phosgène ou dichlorocarbène et monoxyde de carbone CO en anaérobie).

Le CIRC a classé le CCl₄ en « 2B » (peut être cancérigène pour l'Homme) (CIRC, 1999) basé sur des preuves insuffisantes chez l'Homme et suffisantes chez l'animal. Les organes cibles chez l'animal sont le foie (chez le rat, la souris et le hamster) exposés par voie orale et par inhalation et la glande surrénale (phéochromocytome) chez la souris (US EPA, 2005).

Le rapport de l'OMS (1999) reprend les études de génotoxicité cités dans la monographie du CIRC (encore sous presse à l'époque) et les complète. Ses études sont également reprises dans le rapport de l'US EPA (2010) avec une mise à jour bibliographique.

L'OMS conclut que la plupart des études *in vitro* et *in vivo* de mutagenèse et de cytogénotoxicité sont négatives. Quelques études sur les altérations (dommages) à l'ADN sont positives. Des études sur les levures et les plantes sont positives : le CCl₄ induit des mutations et des recombinaisons intra et inter-chromosomiques. Des effets sur des cellules de mammifères *in vitro* indiquent une altération pendant la cytoténèse³. Cet effet serait le résultat de l'interaction du radical ·CCl₃ avec les protéines plutôt qu'avec l'ADN. Des adduits spécifiques carbone-tétrachlorure-ADN n'ont pas été identifiés alors que les adduits polaires observés se formeraient à partir des produits de la peroxydation lipidique. Les cassures de l'ADN et l'aneuploïdie seraient des effets des produits de cette peroxydation. Les effets génotoxiques s'expliquent par une altération des protéines nucléaires et l'altération de l'ADN secondaires à la toxicité du CCl₄.

³ Phase finale de la division cellulaire (une cellule mère donnant deux cellules filles) qui correspond à la séparation physique des deux cellules filles.

Le rapport de l'US EPA présente des conclusions similaires à celles de l'OMS avec une argumentation un peu plus nuancée basée sur des études ultérieures relatives aux adduits de l'ADN et aux liaisons covalentes à l'ADN et également à la cancérogénèse chez l'animal. Les études de génotoxicité présentées dans le rapport de l'US EPA (2010) recouvrent une large période de 40 ans de publications. Plus de 100 études ont été retenues pour l'évaluation de la génotoxicité du CCl₄ ; une priorité est donnée aux études *in vivo* chez les mammifères et de nombreuses études *in vitro* sont citées. Les études sont présentées clairement dans plusieurs tableaux en fonctions des systèmes expérimentaux et des effets et tests utilisés (mutations, cytogénétiques, altération de l'ADN (cassures, adduits à l'ADN, liaisons covalentes à ADN)).

Etant donnée la très importante base de données publiées, la multiplicité des systèmes d'essai et leur différent niveau d'organisation (bactéries, cellules, animal), les différents paramètres biologiques mesurés (endpoints) et les diverses conditions expérimentales (méthode et niveau d'exposition), il a été jugé plus pertinent d'évaluer l'ensemble de ces résultats selon une approche de type Weight of Evidence (WoE)⁴ (Annexe 2).

Pour réaliser une évaluation WoE pour le CCl₄, l'ensemble des tableaux de résultats compilés par l'US EPA (2010) a été utilisé (Annexe 3). La trame de pondération des preuves telle que proposée par l'ECHA (2015) a été utilisée « endpoint » par « endpoint » et l'ensemble des résultats ont été reportés de façon synthétique (test négatif/équivoque/positif) et en utilisant un code couleur (Annexe 2). Une synthèse a ensuite été effectuée afin de totaliser les nombres d'essais menant à des résultats négatifs/équivoques/positifs (Annexe 2).

Une très forte majorité d'études de génotoxicité et de mutagenèse de poids modéré (28 sur 31) ou de poids élevé (27 sur 29) a donné des résultats négatifs pour le CCl₄ (Figure 1). En particulier, les tests d'Ames et les tests *in vivo* du micronucleus et d'aberrations chromosomiques ainsi que les tests sur animaux transgéniques permettent de conclure que le CCl₄ n'induit ni des mutations géniques *in vitro* et *in vivo*, ni des mutations chromosomiques *in vivo*.

La plus forte fréquence de réponses positives (12 sur 25) l'a été pour les méthodes d'essai identifiées comme « Low Weight » alors que la grande majorité de ces études ont parallèlement montré la présence de toxicité susceptible de produire des interférences donc des résultats « faussement » positifs. En outre, les réponses positives ont été obtenues

⁴ En 2015, l'Agence Européenne des produits Chimiques (ECHA) a également publié un document guide spécifique des « endpoints » à partir duquel les principes de poids de la preuve (WoE) sont compatibles. Les poids suivants ont été attribués selon les 4 catégories (pondération des preuves) : Poids négligeable, faible, modéré et élevé .

exclusivement dans des tests d'altération primaire de l'ADN connus comme étant susceptibles aux interférences liées à des niveaux de doses excessifs.

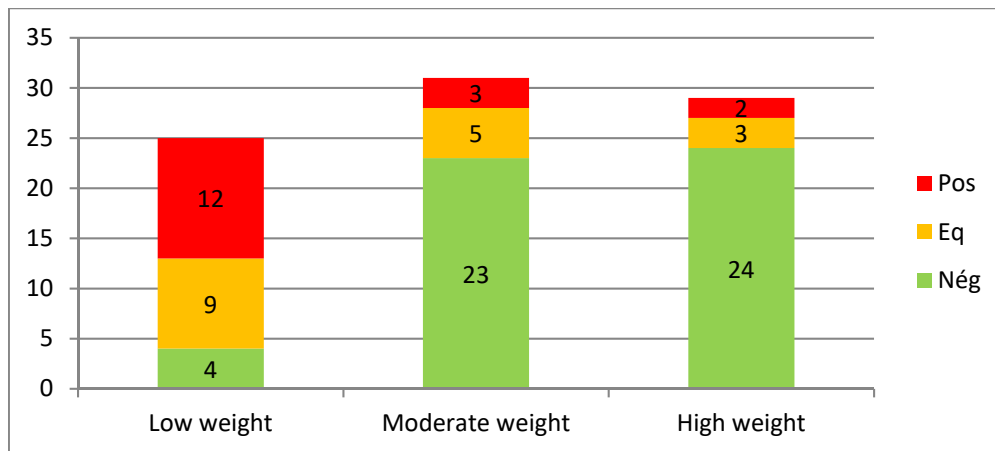


Figure 1 : Synthèse du nombre d'études réalisées sur le CCl₄ menant à des résultats positifs (rouge), équivoques (orange) et négatifs en fonction de la catégorie de poids

Conclusion sur la génotoxicité

En ce qui concerne le mécanisme (mode d'action) de cancérogénèse pour les tumeurs du foie, il n'est pas encore bien établi. L'hypothèse du métabolisme du CCl₄ par le CYP2E1 en un radical trichlorométhyl et autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont les produits de la peroxydation lipidique conduisent à une cytotoxicité soutenue et une prolifération par régénération cellulaire est proposée comme mode d'action.

L'examen critique de l'ensemble des données amène à la conclusion que le CCl₄ n'agit probablement pas selon un mode d'action génotoxique direct et que les dommages oxydatifs à l'ADN sont plutôt indirects/secondaires aux phénomènes de lipo-péroxydation.

Le CES substances considère le CCl₄ comme une substance non génotoxique.

3.6 Cancérogénicité

Chez l'Homme, par voie orale, aucune étude n'est disponible. Par voie inhalée, de nombreuses études ont été conduites en milieu professionnel afin d'évaluer la relation possible entre l'augmentation d'incidence ou de mortalité de cancers et l'exposition au CCl₄. Pour autant, les résultats ne sont pas conclusifs, en raison de nombreux biais (notamment fréquente co-exposition à d'autres composés chimiques).

Ainsi, en l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de conclure définitivement quant à la cancérogénicité du CCl₄ chez l'Homme.

Chez l'animal, par voies orale et inhalée, les études expérimentales (rats, hamsters et certaines espèces de souris) ont apporté des preuves convaincantes concernant la relation entre l'exposition par voie orale du CCl₄ et le risque de cancer du foie (INERIS, 2007).

Par gavage, les études de cancérogénèse du NTP montrent :

- chez la souris (B6C3F1, mâle et femelle), des hépatocarcinomes et des phéochromocytomes,
- chez le rat (Osborne Mendel, mâle et femelle), aucun cancer observé aux doses testées mais des signes de toxicité hépatique : hyperplasie, cirrhose, inclusions de graisses et nodules régénératifs.

Nagano *et al.* (2007a) ont réalisé une étude de cancérogenèse par inhalation chez 50 femelles et 50 rats F344 et souris BDF1, 6 h par jour, 5 jour par semaine pendant 104 semaines. Chez les souris, on a noté une diminution significative de la survie aux doses de 25 et 125 ppm. Une baisse du gain de poids corporel, ainsi que des changements dans les paramètres hématologiques et biochimiques sanguins, dont les enzymes hépatiques, et dans l'analyse d'urine ont été observés aux deux plus fortes doses. Chez les souris mâles, des changements hépatiques, des kystes et une dégénérescence, ont été notés aux doses de 25 et 125 ppm. Dans la rate, il y avait une augmentation des dépôts d'hémossidérine à la dose de 25 ppm, et une hématopoïèse extramédullaire a été observée à 125 ppm. Chez les souris femelles, les changements hépatiques comprenaient des dépôts de céroïde, des thrombus, une nécrose, une dégénérescence et des kystes aux doses de 25 et 125 ppm.

L'incidence de l'adénome hépatocellulaire était significativement accrue aux doses de 25 et 125 ppm chez les mâles et de 5 et 25 ppm chez les femelles. L'incidence du carcinome hépatocellulaire était significativement augmentée aux doses de 25 et de 125 ppm chez les souris mâles et femelles. Quant à l'incidence du phéochromocytome des surrénales, elle était plus élevée chez les souris mâles aux doses de 25 et 125 ppm et chez les souris femelles à la dose de 125 ppm (Tableau 5 et Tableau 6).

En conclusion, par voie inhalée, l'étude de Nagano *et al.* (2007a) montre :

- chez la souris (BDF1, mâle et femelle), des adénomes et carcinomes hépatiques et des phéochromocytomes,
- chez le rat (F344, mâle et femelle), des adénomes et carcinomes hépatiques.

Tableau 5 : Incidence des tumeurs chez la souris (Nagano *et al.* 2007a)

Group	Male					Female				
	Control	5 ppm	25 ppm	125 ppm	Peto	Control	5 ppm	25 ppm	125 ppm	Peto
No. of animals examined	50	50	50	50		50	49 ^a	50	49 ^a	
Neoplastic lesions										
Liver										
Heptocellular adenoma	9	10	27 ^{**}	16	↑↑	2	8 [*]	17 ^{**}	5	↑↑
Hepatocellular carcinoma (Metastasis to lung)	17 (3)	12 (3)	44 ^{**} (10)	47 ^{**} (14)	↑↑	2 (1)	1 (0)	33 ^{**} (4)	48 ^{**} (8)	↑↑
Hepatocellular tumors ^b	24	20	49 ^{**}	49 ^{**}	↑↑	4	9	44 ^{**}	48 ^{**}	↑↑
Adrenal gland										
Pheochromocytoma: benign	0	0	16 ^{**}	31 ^{**}	↑↑	0	0	0	22 ^{**}	↑↑
Pre-neoplastic lesions										
Liver										
Altered cell foci	4	7	1	1		1	0	0	2	
Clear cell foci	2	6	0	1		1	0	0	0	
Acidophilic cell foci	1	1	1	0		0	0	0	1	
Basophilic cell foci	1	1	0	0		0	0	0	1	
Non-neoplastic lesions										
Liver										
Deposit of ceroid	2	1	36 ^{**}	36 ^{**}		0	0	28 ^{**}	35 ^{**}	
Proliferation: bile duct	0	0	19 ^{**}	22 ^{**}		0	0	5 [#]	9 ^{**}	
Hydropic change: centrilobular	1	0	8 [#]	9 ^{**}		1	0	13 ^{**}	12 ^{**}	

Note. Values indicate number of animals bearing lesion. Significant difference indicated by * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$ by Fisher exact test; [#] $p \leq .05$, ^{**} $p \leq .01$ by chi-square test; ↑ $p \leq .05$, ↑↑ $p \leq .01$ by Peto's test.
^aNumber of mice examined was 49 instead of 50, because one mouse accidentally died.
^bHepatocellular tumors include hepatocellular adenoma and hepatocellular carcinoma.

Tableau 6 : Incidence des tumeurs chez le rat (Nagano *et al.* 2007a)

Group	Male					Female				
	Control	5 ppm	25 ppm	125 ppm	Peto	Control	5 ppm	25 ppm	125 ppm	Peto
No. of animals examined	50	50	50	50		50	50	50	50	
Neoplastic lesions										
Liver										
Hepatocellular adenoma	0	1	1	21 ^{**}	↑↑	0	0	0	40 ^{**}	↑↑
Hepatocellular carcinoma (Metastasis to lung)	1 (0)	0 —	0 —	32 ^{**} (4)	↑↑	0 —	0 —	3 (0)	15 ^{**} (1)	↑↑
Hepatocellular tumors ^a	1	1	1	40 ^{**}	↑↑	0	0	3	44 ^{**}	↑↑

3.7 Mécanismes d'action

La toxicocinétique du CCl₄ renseigne sur la localisation de la toxicité du composé. La substance est fortement métabolisée par les isoenzymes du CYP 2E1, localisé au niveau centrolobulaire hépatique. Les métabolites primaires ainsi formés sont très réactifs (radicaux libres trichlorométhyl et peroxytrichlorométhyl) et se lient préférentiellement aux acides gras des membranes phospholipidiques, entraînant un mécanisme de peroxydation lipidique. S'ensuit une rupture membranaire et une libération de composés cytoplasmiques (tels que les microsomes hépatiques). Certains de ces sous-produits peuvent former des adduits aux protéines et à l'ADN.

Des agents antioxydants tel que le glutathion peuvent bloquer le mécanisme de peroxydation lipidique. Quand ces systèmes sont dépassés (épuisement des réserves de glutathion par exemple), le phénomène s'amplifie. Les concentrations en calcium intracellulaire augmentent, activant des protéases et des phospholipases calcium-dépendantes intensifiant la destruction des membranes phospholipidiques, ainsi que des endonucléases à l'origine d'une destruction du matériel génétique et d'une mort des cellules. La régénération et la prolifération cellulaire qui s'ensuit augmente la probabilité de fixation de mutations induites par la peroxydation lipidique ou l'action des endonucléases au niveau de l'ADN pouvant entraîner un processus de cancérogenèse (Eastmond, 2008 ; Manibusan, 2007).

Il est à noter que l'hépatotoxicité n'est pas liée à une prolifération des peroxysomes, mécanisme principalement retrouvé chez l'animal et pas toujours considéré comme transposable chez l'Homme. En effet, ce mécanisme fait intervenir les CYP 3A4 non impliqués dans le métabolisme du CCl₄.

3.8 Extrapolation de l'animal à l'Homme

Dans les études toxicologiques, lors des examens histopathologiques, des fibroses et cirrhoses ont été observées chez les rats traités à de fortes doses de CCl₄, contrairement aux souris pour lesquelles ces effets n'ont pas été décrits. Ces étapes sont également retrouvées dans le processus de cancérogenèse hépatique chez l'Homme. Ainsi, l'ATSDR (2000) conclut que cette espèce est la plus proche de l'homme.

Par voie orale, des hépatocarcinomes ont été observés chez la souris uniquement, reflétant une plus grande sensibilité de cette espèce.

Toutefois, d'après le mécanisme d'action, les signes d'hépatotoxicité sont retrouvés chez le rat et la souris, première étape vers le phénomène de fibrose puis cirrhose. Il n'apparaît donc pas plus pertinent de privilégier les données chez la souris par rapport au rat.

De nombreuses études rapportent que les doses critiques associées aux effets hépatotoxiques du CCl₄ sont généralement plus élevés par voie inhalée que par voie orale. Ceci serait lié au phénomène de premier passage hépatique par voie orale (Nagano *et al.*, 2007b). En l'absence de données complémentaires, les études conduites chez l'animal par voie inhalée sont alors à privilégier et l'hypothèse de transposition de voie à voie n'est pas retenue.

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

Tableau 7 : VTR disponibles pour des expositions subchronique/chronique par inhalation

Organisme	VTR subchronique	VTR chronique à seuil			
	ATSDR	RIVM	ATSDR	OEHHA	US EPA
Année	2005	2001	2005	2000	2010
VTR	MRL	VTR	MRL	REL	RfC
Valeur VTR	180 µg.m ⁻³	60 µg.m ⁻³	180 µg.m ⁻³	40 µg.m ⁻³	100 µg.m ⁻³
Effet critique	Augmentation du poids du foie, modifications histologiques	Effets hépatiques	Augmentation du poids du foie, modifications histologiques et biochimiques	Augmentation du poids du foie, modifications histologiques	Modification graisseuses au niveau hépatique
Espèce	Rat	Rat	Rat	Cobaye	Rat
Voie d'exposition	Inhalation	Inhalation	Inhalation	Inhalation	Inhalation
Dose critique	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	NOAEC = 5 ppm (30 mg.m ⁻³)	BMC _{10%} L _{95%} HEC = 14.3 mg.m ⁻³ basée sur l'utilisation d'un modèle PBPK
Ajustements	NOAEC _{ADJ} = 5,4 mg.m ⁻³	NOAEC _{ADJ} = 6,4 mg.m ⁻³	NOAEC _{ADJ} = 5,4 mg.m ⁻³	NOAEC _{ADJ} = 5,4 mg.m ⁻³ NOAEC _{HEC} = 10,2 mg.m ⁻³	
UF	30 UF _A = 3 UF _H = 10	100 UF _A = 10 UF _H = 10	30 UF _A = 3 UF _H = 10	300 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 3 UF _S = 3	100 UF _{A-TD} = 3 UF _H = 10 UFD = 3
Référence	Adams <i>et al.</i> , 1952	source non communiquée, Adams <i>et al.</i> , 1952	Adams <i>et al.</i> , 1952	Adams <i>et al.</i> , 1952	Nagano <i>et al.</i> , 2007 a

Tableau 8: VTR sans seuil disponibles pour des expositions chroniques par inhalation

Organisme	OEHHA	US EPA
Année	2000	2010
VTR	ERUi	ERUi
Valeur VTR	$4,2 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$	$6 \cdot 10^{-6} (\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$
Effet critique	Augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques (carcinomes hépatocellulaires et hépatomes)	Augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques (carcinomes hépatocellulaires et hépatomes)
Espèce	Hamster, souris	Souris
Voie d'exposition	Inhalation	Inhalation
Construction	Extrapolation voie à voie	Extrapolation linéaire à l'origine
Référence	Della Porta <i>et al.</i> , 1961; Edwards <i>et al.</i> , 1942	Nagano <i>et al.</i> , 2007 a

5 Proposition de VTR chronique par voie inhalation

5.1 Choix de l'effet critique et de l'hypothèse de construction

D'après les études disponibles, les effets les plus sensibles (apparaissant aux doses testées les plus faibles) sont les effets hépatiques et plus particulièrement l'augmentation du poids relatif du foie, l'apparition de modifications histologiques des hépatocytes ainsi que l'augmentation des paramètres biochimiques hépatiques (transaminases ASAT, ALAT, LDH, PAL). D'après plusieurs publications, les modifications histologiques (larges inclusions graisseuses, globules cytoplasmiques) correspondent à des altérations morphologiques d'origine dégénérative plutôt qu'adaptative, à la différence de l'augmentation du poids du foie. Elles peuvent être considérées comme des signes sensibles de la toxicité hépatique du CCl₄ et pourraient être retenues comme effet critique précurseur de l'effet cancérigène hépatique du CCl₄ (Nagano *et al.*, 2007 b; Adams *et al.*, 1952).

D'après les données de toxicité observées chez l'animal et les informations sur le mécanisme d'action cancérigène, le CCl₄ est un composé cancérigène, génotoxique à des doses supérieures aux doses cytotoxiques. Des événements biologiques pourraient être considérés comme précurseurs de la formation des hépatocarcinomes observés chez l'animal, notamment la cytotoxicité et la prolifération régénérative des hépatocytes. Les études animales de cancérogenèse montrent une relation dose-réponse pour la formation d'hépatocarcinomes.

Ce faisceau d'arguments soutient l'hypothèse que le CCl₄ est un **composé cancérigène à seuil** de dose. Les carcinomes hépatocellulaires observés chez l'animal sont directement consécutifs à une augmentation de la prolifération cellulaire régénérative en réponse à un phénomène de cytotoxicité et de nécrose. En effet, les cancers sont observés pour des concentrations cytotoxiques hépatiques. De plus, les résultats des tests de génotoxicité confortent cette hypothèse.

Le CES considère la toxicité hépatique et l'effet cancérigène comme effets critiques.

5.2 Analyse des VTR existantes

Parmi les VTR chroniques à seuil (mécanisme retenu par le CES substance) existantes pour la voie respiratoire, l'OEHHA et le RIVM se basent sur l'étude d'Adams *et al.* (1952). Cette étude est reprise par de nombreux organismes pour élaborer leur VTR. Cependant cette étude ne suit pas les critères de qualité recommandés par la méthodologie du CES « Substances » (étude ancienne ne suivant pas de protocole standardisé, données incomplètes). Cette étude et les VTR associées ne peuvent donc pas être retenues.

L'ATSDR propose une valeur de 180 µg.m⁻³, basée sur les effets hépatiques chez le rat (augmentation du poids du foie, modifications histologiques et biochimiques) avec un NOAEL de 5 ppm (30 mg.m⁻³).

L'US EPA propose une valeur de 100 µg.m⁻³, basée sur les effets hépatiques chez le rat (modification graisseuses au niveau hépatique chez le rat) avec le calcul d'une BMC_{10%}L_{95%} équivalente humaine (14,3 mg.m⁻³).

Le CES n'a pas souhaité retenir les VTR de l'ATSDR et l'US EPA car, même si les effets hépatiques sont considérés comme des effets pertinents et pourraient être retenus comme effet critique précurseur de l'effet cancérigène hépatique du CCl₄, il manque une comparaison des différentes concentrations critiques associées aux deux types d'effet (hépatique et cancer) à travers la détermination d'une BMD pour chaque effet.

D'autre part, les modèles PBPK rat et Homme utilisés par l'US EPA pour l'extrapolation animal-Homme puis pour déterminer la concentration d'exposition journalière ont été évalués par le CES. Il en ressort que :

- la capacité prédictive du modèle PBPK chez l'Homme est limitée à l'air exhalé. Il n'y a pas de données humaines qui permettraient de comparer les prédictions du modèle avec des données mesurées (métabolisme hépatique, concentrations sanguines, hépatiques ou dans les tissus adipeux). Or, c'est précisément sur la base du métabolisme hépatique et de la concentration moyenne artérielle que l'extrapolation animal-Homme a été réalisée. Le modèle n'est donc pas validé pour ces deux unités de mesures de doses internes.
- la capacité prédictive du modèle PBPK rat est faible. La comparaison entre les prédictions des concentrations sanguines et celles mesurées après une exposition de Rat F344/Crl BR à 20 ppm pendant 4 heures (Benson *et al.*, 2001) se situe dans un ratio >2 (considéré comme inadéquat par l'OMS (OMS, 2010)).

En conclusion, le modèle PBPK chez l'Homme ne peut donc pas être utilisé pour une évaluation de risque ni pour établir une VTR.

En conclusion, le CES ne retient aucune VTR proposée par les organismes et décide de construire une VTR chronique à seuil pour la voie respiratoire.

5.3 Construction de VTR

5.3.1 Choix de l'étude clé

Nagano *et al.* ont publié en 2007b une étude de toxicité sur 13 semaines (90 jours) chez le rat F344 et la souris BDF1, des deux sexes. Les animaux ont été exposés 6h/j, 5j/7 selon 5 groupes de doses : 0, 10, 30, 90, 270, 810 ppm (concentrations nominales). Les auteurs ont recherché les lésions hépatiques et rénales, les modifications des paramètres hématologiques. Un suivi du poids des organes a également été réalisé (absolu et relatif). En prime, les auteurs ont recherché un marqueur primitif de tumeur pour les rats mâles à 810 ppm (foyers d'altération cellulaire hépatique révélés par une glutathion-transférase de type primitif / placentaire – GST-P).

Nagano *et al.* (2007a) ont réalisé une étude de cancérogenèse par inhalation chez 50 femelles et 50 rats F344 et souris BDF1, 6h par jour, 5 jour par semaine pendant 104 semaines (avec les mêmes lots d'animaux témoins). Les groupes de doses administrées sont de 5, 25 et 125 ppm (concentrations nominales). Des adénomes et carcinomes hépatocellulaires ont été observés chez les rats et les souris des deux sexes. Des phéochromocytomes (glandes surrénales) ont également été observés chez les souris des deux sexes.

Ces deux études sont de qualité suffisante pour être considérées comme études clés.

5.3.2 Choix de la dose critique

A partir de l'étude 13 semaines de Nagano *et al.* (2007b) :

Les données de l'étude 13 semaines de Nagano *et al.* (2007b) permettraient d'argumenter pour retenir **une LOAEC à 10 ppm**. Ce choix ne respecte pas les préconisations de la méthodologie qui suggèrent de privilégier la construction d'une BMD en premier lieu, de retenir une NOAEC en second choix et une LOAEC en dernière option.

Plusieurs effets observés dès 10 ppm sont corrélés, d'après le mécanisme d'action du CCl₄, à des événements précurseurs pouvant être prédictifs de l'apparition de carcinomes hépatocellulaires :

- Augmentation du taux d'enzymes hépatiques (ASAT, ALAT, PAL)
- Inclusion de globules cytoplasmiques dans les hépatocytes (souris mâles)
- Observation de larges gouttelettes graisseuses dans les hépatocytes (rats, souris mâles).

L'utilisation d'une BMD n'a pas été possible pour les raisons suivantes : s'agissant de la prise en compte de plusieurs effets (modifications enzymatiques et histologiques), les différentes valeurs associées à ces effets ne permettent pas de déterminer une BMD. S'agissant d'effets précurseurs, il n'a pas été jugé pertinent d'appliquer une modélisation sur l'ensemble de la relation dose-réponse. En effet, à partir d'une certaine concentration, l'hépatotoxicité peut être masquée par d'autres effets toxiques sur la cellule entraînant, de manière artificielle, une diminution de la réponse associée à des concentrations plus élevées.

D'après le protocole expérimental de l'étude de Nagano *et al.* (2007b), les gammes de doses testées ne permettent pas de définir une concentration sans effet néfaste observé (NOAEC). En effet, la plus faible des concentrations testées correspond à la LOAEC décrite précédemment. Néanmoins, certains organismes (RIVM, ATSDR et OEHHA) ayant élaboré des VTR pour le CCl₄ ont retenu une étude (Adams *et al.*, 1952) permettant de déterminer des NOAEC à 5 ppm sur la base de modifications biologiques et histochimiques observées chez le rat. Pour autant, cette étude n'est pas retenue dans le cadre de cette évaluation car jugée de qualité insuffisante pour l'élaboration d'une VTR.

A partir de l'étude cancérogène de Nagano *et al.* (2007a) :

Les données de l'étude cancérogène de Nagano *et al.* (2007a) mettent en évidence une relation entre l'augmentation des tumeurs et la concentration journalière d'exposition au CCL₄. Celle-ci a été modélisée avec le logiciel BMDs 2.1.1 de l'US EPA pour l'élaboration d'une Benchmark Dose (BMD). Le modèle log-logistique a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% d'une dose correspondant à une augmentation de 10% de la réponse par rapport au groupe non exposé (Figure 2).

Tableau 9 : Résumé de l'augmentation de tumeurs chez les femelles BDF1

Incidence of liver tumors in female BDF1 mice exposed to carbon tetrachloride vapor for 104 weeks (6 hours/day, 5 days/week)				
Tumor	Tumor incidence			
	0 ppm	5 ppm	25 ppm	125 ppm
Hepatocellular adenoma or carcinoma	4/50 ^a	9/49	44/50 ^b	48/49 ^b

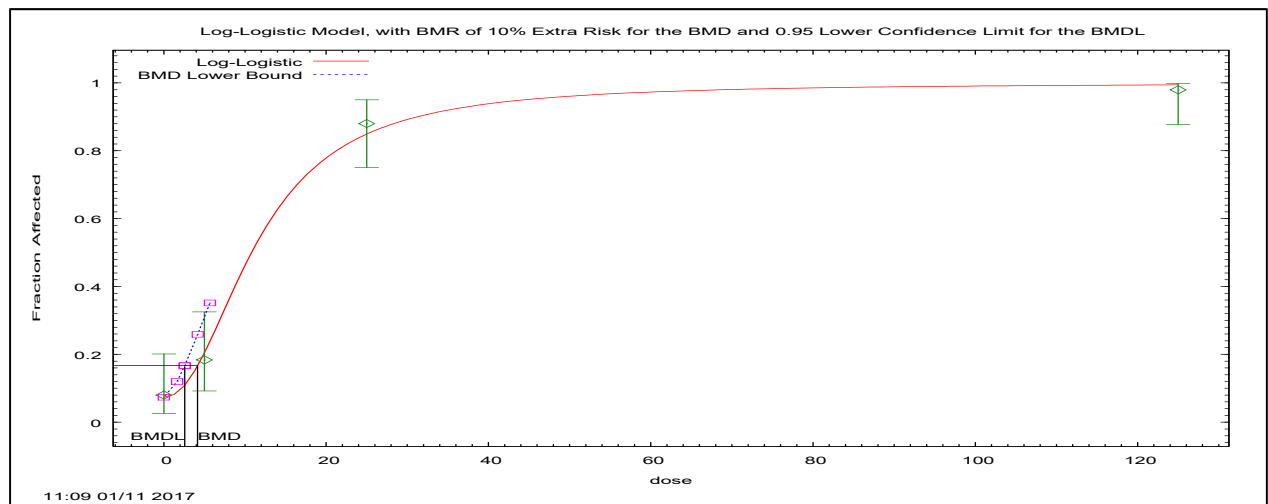


Figure 2 : Relation entre l'augmentation de tumeur et la concentration journalière d'exposition au CCL₄

Les concentrations critiques calculées sont :

$$\text{BMD}_{10\%} = 4,2 \text{ ppm et } \text{BMD}_{10\%} \text{ L}_{95\%} = 2,6 \text{ ppm}$$

5.3.3 Ajustement temporel

Dans l'étude 13 semaines, les animaux ont été exposés 6 heures /24 et 5 jours sur 7. Pour tenir compte de la discontinuité de l'exposition, un ajustement temporel a été effectué :

$$\text{LOAEC}_{\text{ADJ}} = 10 \text{ ppm} \times 6/24 \times 5/7 = 1,8 \text{ ppm} = 11,4 \text{ mg.m}^{-3}$$

Dans l'étude de cancérogénèse, les animaux ont été exposés 6 heures /24 et 5 jours sur 7. Pour tenir compte de la discontinuité de l'exposition, un ajustement temporel a été effectué

$$\text{BMDL}_{\text{ADJ}} = 2,6 \text{ ppm} \times 6/24 \times 5/7 = 0,46 \text{ ppm} = 2,91 \text{ mg.m}^{-3}$$

5.3.4 Ajustement dosimétrique

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une concentration équivalente humaine (HEC = Human Equivalent concentration) est calculée.

Pour la voie respiratoire, l'US EPA a développé différents ajustements dosimétriques qui sont réalisés en fonction des propriétés physicochimiques de la substance inhalée (particules ou gaz, fortement solubles ou peu solubles dans l'eau) et du site où sont observés les effets critiques (respiratoires ou extra-respiratoires) conduisant à différentes équations (US EPA, 1994).

D'après les recommandations de l'US EPA (1994), le CCl₄ est considéré comme un **gaz de catégorie 3** car elle a une action systémique. Ainsi, l'ajustement dosimétrique appliqué par défaut pour un gaz de catégorie 3 est la suivante :

$$(\text{concentration critique})_{\text{Homme}} = (\text{concentration critique})_{\text{animal}} \times (\text{Hb/g})_{\text{animal}} / (\text{Hb/g})_{\text{Homme}}$$

Avec (Hb/g) : coefficient de partage sang/air

Les coefficients de partage sang/air du CCl₄ pour l'Homme et le rat n'étant pas connus, l'US EPA propose de retenir la valeur par défaut de 1 (US EPA, 1994).

5.3.5 Choix des facteurs d'incertitudes

A partir de l'étude 13 semaines de Nagano et al. (2007b) :

Le calcul de la VTR à partir de CCl₄ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une concentration équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 1

Un UF_S a été envisagé, l'étude clé retenue pour la construction de la VTR étant une étude réalisée en exposition subchronique. Cependant, par consensus d'experts, pour ce type d'effet, il est estimé qu'une étude par exposition subchronique de 90 jours est adéquate pour la construction d'une VTR chronique sans ajout de facteur d'incertitude

supplémentaire. D'autre part, dans l'étude de cancérogenèse de Nagano *et al.* (2007 a) par inhalation, réalisée avec les mêmes souches animales et dans les mêmes conditions expérimentales, une toxicité a été observée (augmentation significative des enzymes hépatiques, modification graisseuses) à partir de 25 ppm pour le rat et la souris.

- Utilisation d'une BMDL, d'une LOAEC ou d'une NOAEC (UF_{B/L}) : 3

Il est proposé de retenir un facteur de **3** car la LOAEC déterminée correspond à la survenue d'effets précurseurs de faible sévérité.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10
- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 75 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

A partir de l'étude cancérogène de Nagano *et al.* (2007a) :

Le calcul de la VTR à partir de CCl₄ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2015) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une concentration équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Transposition subchronique à chronique (UF_S) : 1
- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10
- Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL/C ou d'un NOAEL/C (UF_{B/L}) : 1
- Insuffisance des données (UF_D) : 1

Un facteur d'incertitude global de 25 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.3.6 Proposition de VTR chronique par voie respiratoire

A partir de l'étude 13 semaines de Nagano *et al.* (2007b), on obtient une VTR basée sur la toxicité hépatique chez le rat de 0,15 mg.m⁻³ (soit 0,024 ppm).

A partir de l'étude cancérogène de Nagano *et al.* (2007a), on obtient une VTR basée sur l'apparition des tumeurs hépatiques chez le rat de 0,11 mg.m⁻³ (soit 0,0184 ppm).

Même si la toxicité hépatique observée notamment dans l'étude Nagano *et al.* (2007b) pourrait être considérée comme un effet précurseur de la cancérogène hépatique du CCl₄, le

CES retient la VTR construite à partir de l'étude de cancérogenèse de Nagano *et al.* (2007 a) car celle-ci est la plus protectrice.

VTR = 0,11 mg.m⁻³ (soit 0,0184 ppm).

5.3.7 Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données : fort

L'analyse bibliographique a révélé qu'il existait de nombreuses études sur le **CCl₄**.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : moyen

L'effet est bien décrit par les auteurs, et retrouvé dans d'autres publications. Cependant, cet effet n'a pas été confirmé chez l'Homme.

- Niveau de confiance dans choix de l'étude clé : Fort.

Il s'agit d'une étude bien détaillée qui suit les lignes directrice

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : fort

Une BMD a pu être construite.

Le niveau de confiance global pour cette VTR est donc **moyen**.

6 Conclusions du CES

Une VTR chronique par voie inhalation est proposée pour le tétrachlorure de carbone basée les adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez la souris (Tableau 10). Un niveau de confiance moyen a été attribué à cette VTR.

Tableau 10 : VTR chronique par voie respiratoire pour le tétrachlorure de carbone

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez la souris Nagano <i>et al.</i> (2007a)	BMD10%L95%=2,6 ppm BMDL _{ADJ} = 2,6 ppm x 6/24 x 5/7 = 0,46 ppm = 2,91 mg.m ⁻³	25 UF _A = 2,5 UF _H = 10	0,11 mg.m ⁻³ (soit 0,0184 ppm)
			Niveau de confiance moyen

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 22/06/2017.

Signature :

Maisons-Alfort, le _____,

Au nom des experts du CES

« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »,

M Guerbet

Président du CES

7 Bibliographie

Date de fin de la bibliographie : 01/05/2017

Adams EM, Spencer HC, Rowe VK, McCollister DD, Irish DD. 1952. Vapor toxicity of carbon tetrachloride determined by experiments on laboratory animals. *Arch Ind Hyg Occup Med*, 6:50-66.

ATSDR. 2005. Toxicological profile for carbon tetrachloride. U.S. Department of health and human services. Public health service.

Benson, JM; Tibbetts, BM; Thrall, KD; et al. (2001) Uptake, tissue distribution, and fate of inhaled carbon tetrachloride: comparison of rat, mouse, and hamster. *Inhal Toxicol* 13:207–217.

David A, Frantik E, Holusa E, Novakova O. Role of time and concentrations on carbon tetrachloride toxicity in rats. *Int Arch Occup Environ Health*. 48(1):49-60 (1981).

Eastmond DA. 2008. Evaluating genotoxicity data to identify a mode of action and its application in estimating cancer risk at low doses : a case study involving carbon tetrachloride. *Environ Mol Mutagen*. Jan 22;49(2):132-141.

INERIS. 2005. Tétrachlorure de carbone. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.

INERIS. 2007. Rapport d'étude n° 06CR072. Analyse et construction des VTR pour le 1,2-dichloroéthane, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le chlorure de méthylène.

Manibusan MK, Odin M ; Eastmond DA. 2007. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. Jul-Sep;25(3):185-209.

Marchand, C., McLean, S. et Plaa, G.L. (1970). The effect of SKF 525A on the distribution of carbon tetrachloride in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 174 : 232–238.

Nagano K, Nishizawa T, Yamamoto S, Matsushima T. 1998. Inhalation carcinogenesis studies of six halogenated hydrocarbons in rats and mice. *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Diseases*, Elsevier Science B.V., pp 741-746.

Nagano K, Umeda Y, Saito M, Nishizawa T, Ikawa N, Arito H, Yamamoto S et Fukushima S. Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Occup Health* 2007;49:249-259

National Toxicology Program. Database Search Application. Dernière consultation le 21/02/08.

OEHHA (Office of environmental health hazard assessment). Determination of noncancer chronic reference exposure levels. Chronic toxicity summary. Carbon tetrachloride. Décembre 2000.

Paul, B.B . et Rubinstein, D. (1963). Metabolism of carbon tetrachloride and chloroform by the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 141 : 141–148.

Paustenbach, D.J., Carlson, G.P., Christian, J.E. et Born, G.S. (1986). A comparative study of the pharmacokinetics of carbon tetrachloride in the rat following repeated inhalation exposures of eight and 11.5 h/day. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 6 : 484–497.

RIVM. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. RIVM report 711701 025. Mars 2001.

Sanzgiri, U.Y., Kim, H.J., Muralidhara, S., Dallas, C.E. et Bruckner, J.V. (1995). Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics et acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134 : 148–154.

Sanzgiri, U.Y., Srivatsan, V., Muralidhara, S., Dallas, C.E. et Bruckner, J.V. (1997). Uptake, distribution, elimination of carbon tetrachloride in rat tissue following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143 : 120–129.

US EPA 2010. Toxicological review of carbon tetrachloride.

WHO (2010) Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment,

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2016 -SA- 0 1 6-2



25 JUIN 2016

MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

Direction générale de la santé
Sous-direction « Prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation »

Bureau « Qualité des eaux »

Personne chargée du dossier :
Béatrice JÉDOR
Tél. : 01.40.56.45.99
Fax : 01.40.56.50.56
Mél : beatrice.jedor@sante.gouv.fr

**Bureau « Environnement intérieur, milieux
du travail et accidents de la vie courante »**

Personne chargée du dossier :
Bérengère LEDUNOIS
Tél. : 01.40.56.58.51
Fax : 01.40.56.50.56
Mél : berengere.ledunois@sante.gouv.fr

DGS/EA2/EA4 – N° 139 313

Paris, le 22 JUIL. 2016

Le Directeur général de la santé

à

**Monsieur le Directeur général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du
travail**

Direction Evaluation des Risques (D.E.R.)

**14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS-ALFORT Cedex**

Objet : Détermination de valeurs sanitaires pour le tétrachlorure de carbone dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans l'air intérieur (Bas-Rhin)

N/Réf. : DGS EA2/EA4 N° 160005 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

PJ : 2

L'Agence régionale de santé (ARS) Alsace Champagne-Ardenne Lorraine m'a sollicité concernant la présence de tétrachlorure de carbone dans l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) et dans l'air intérieur de logements dans le département du Bas-Rhin (cf. PJ), faisant suite au renversement d'un camion citerne sur la commune de Benfeld en 1970.

La pollution de la ressource en eau par le tétrachlorure de carbone (n° CAS 56-23-5) a été détectée en 1992 au niveau du forage « Negerdorf » situé sur la commune d'Erstein, à des concentrations variant entre 9,5 et 65 µg/L en 1992.

Le traitement par stripping mis en place en novembre 1992 pour permettre la distribution d'une eau conforme à la recommandation de l'OMS (2 µg/L) retenue à l'époque en l'absence d'exigence de qualité pour ce paramètre, a été interrompu en 1999 et le captage a été arrêté. Certains usages de l'eau et la création de puits privés pour des usages EDCH, agricoles ou industriels sont interdits par arrêtés municipaux sur la zone du panache de pollution (usages d'eau potable, arrosage des jardins privés, niveaux puits d'irrigation). Depuis, le réseau de distribution est alimenté à partir du puits du Breitenbruch, situé à Hindisheim mais qui présente des teneurs en manganèse supérieures à la référence de qualité.

Deux sites de dépollution fonctionnent depuis juillet 2006 et ont permis de réduire considérablement l'importance de la source de pollution et son incidence sur la qualité des eaux

1/2

souterraines. Cependant, une baisse de l'efficacité du dispositif est constatée sur la zone source (lieu du déversement accidentel de 4 000 litres de tétrachlorure de carbone en 1970 identifié comme étant la cause de la pollution) et sur la zone en aval la plus proche.

Actuellement, les concentrations en tétrachlorure de carbone au niveau du forage « Negerdorf » seraient de l'ordre de 3 à 5 µg/L, ce qui permet d'envisager la remise en service de ce forage à moyen terme afin de sécuriser l'alimentation en eau potable du secteur dans le cadre du schéma directeur d'alimentation en eau potable. L'augmentation du débit de pompage du puits du Breitenbruch apparaît en effet délicate et ne permet pas de sécuriser l'alimentation en eau potable de cette zone géographique. Par conséquent, il est nécessaire de diversifier les ressources en eau. Les procédures d'autorisation et de déclaration d'utilité publique du forage « Negerdorf », qui pourraient être engagées en 2017, devront prendre en compte l'évaluation et la gestion de risques sanitaires liés à la présence de tétrachlorure de carbone dans l'EDCH. Par ailleurs, l'étude d'impact qui sera réalisée dans le cadre de la procédure d'autorisation du forage permettra notamment d'évaluer les conséquences du pompage sur le panache de pollution, les zones de restriction pourraient ainsi être mises à jour.

S'agissant de l'exposition de la population au tétrachlorure de carbone par inhalation, des prélèvements d'air ont été réalisés en 2005 à l'intérieur de logements situés sur la commune de Benfeld aux environs de la zone de déversement. Les concentrations maximales mesurées étaient à l'époque de l'ordre de 1,6 µg/m³ (cf. rapport ANTEA ci-joint). La collectivité envisage de faire réaliser de nouvelles mesures dans l'air intérieur.

Dans ce contexte, en l'absence de valeurs réglementaires pour l'EDCH et de l'existence de plusieurs valeurs toxicologiques de référence par inhalation dans la littérature (AFSSET et US-EPA) et afin de pouvoir proposer des mesures de gestion adaptées le cas échéant, je vous demande de bien vouloir déterminer les valeurs sanitaires à retenir par ingestion et par inhalation (VTR chronique).

En tant que de besoin, mes services transmettront par courriel des données sur la qualité des EDCH vis-à-vis du tétrachlorure de carbone, obtenues dans le cadre du contrôle sanitaire ou d'études pilotées par les ARS et renseignées dans la base nationale SISE-Eaux ainsi que les résultats du contrôle sanitaire effectué sur le forage « Negerdorf » jusqu'en 2001. Par ailleurs, les résultats des analyses réalisées dans le cadre du réseau de surveillance de la qualité de la nappe d'Alsace piloté par l'Association pour la Protection de la Nappe Phréatique de la Plaine d'Alsace (APRONA) sont disponibles sur le site internet de cette Association (www.aprona.net).

Le dossier est enregistré par mes services sous le numéro 160005 et intitulé comme suit :

DETERMINATION DE VALEURS SANITAIRES POUR LE TETRACHLORURE DE CARBONE DANS L'EAU DESTINEE A LA CONSOMMATION HUMAINE ET DANS L'AIR INTERIEUR

Je vous remercie de bien vouloir me transmettre, dans les meilleurs délais, votre proposition de contrat d'expertise comprenant notamment les modalités de traitement et de restitution des travaux, dont le rendu final est attendu pour le 30 juin 2017.

Le Directeur Général de la Santé,



Professeur Benoît VALLET

2/2

Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport

Date	Version	Description de la modification
Avril 2009	01	Rapport relatif à l'élaboration de VTR fondées sur les effets cancérogènes pour le chloroforme, le tétrachlorure de carbone et le 1,2-dichloroéthane
Juin 2017	02	Séparation du précédent rapport en 3 rapports différents : 1 par substance Révision de la VTR du tétrachlorure de carbone

Annexe 3 : Evaluation du mode d'action génotoxique (direct ou indirect) du tétrachlorure de carbone (CCl₄)

Préambule

La présente expertise a pour objet de définir s'il est possible (ou non) de déterminer le(s) mécanisme(s) d'action cancérogène(s) du tétrachlorure de carbone (CCl₄) en particulier de définir si son activité génotoxique est directe ou indirecte. Elle s'appuie essentiellement sur 2 rapports d'évaluation internationale, celui de l'OMS (WHO, 2009) et celui de l'U.S-EPA (2010).

Etant donnée la très importante base de données publiées, la multiplicité des systèmes d'essai et leur différent niveau d'organisation (bactéries, cellules, animal), les paramètres biologiques (endpoints) mesurés et les diverses conditions expérimentales (méthode et niveau d'exposition)..., seule une approche de type WoE (Weight of Evidence, poids de la preuve) a été jugée pertinente pour évaluer l'ensemble de ces résultats. En outre, le type d'effet a, quand cela était possible, été relié à un niveau et à une durée d'exposition.

Ainsi, la présente expertise est divisée en 4 parties principales :

- Rationnel de l'utilisation d'une approche WoE,
- Résultats de l'approche WoE pour le CCl₄
- Conclusions de l'analyse WoE pour le mode d'action génotoxique du CCl₄
- Conclusion générale

1. Rationnel de l'utilisation d'une approche Weight of Evidence (WoE)

Les données provenant de différents types de cellules doivent être soigneusement étudiées. De nombreux scientifiques recommandent maintenant l'utilisation de lignées cellulaires humaines plutôt que des cellules de rongeurs (Honma et Hayashi, 2011) même si des lignées cellulaires avec par exemple des mutations au niveau de p53 (ou déficient en p53) sont généralement plus sensibles aux dommages génétiques.

Les lignes directrices de l'OCDE indiquent "*At the present time, the available data do not allow firm recommendations to be made but suggest it is important, when evaluating chemical hazards to consider the p53 status, genetic (karyotype) stability, DNA repair capacity and origin (rodent versus human) of the cells chosen for testing*". Ainsi, si les données disponibles ne permettent pas de faire des recommandations fermes, elles suggèrent qu'il est important d'évaluer les risques chimiques en considérant le statut p53, la stabilité génétique, la capacité de réparation de l'ADN et l'origine (murine *versus* humaine) des cellules choisies pour les tests". Les résultats *in vitro* obtenus sur des cellules de mammifères doivent donc être interprétés avec prudence et le poids de leur contribution dans l'évaluation globale doit prendre en compte ces limites potentielles.

Les résultats «faussement» positifs (signifiant ici en termes de prédiction du potentiel cancérigène) sont à prévoir lorsqu'on dispose d'un grand nombre de données, tel que c'est le cas pour le CCl₄, et la compréhension de leur impact sur l'évaluation et l'interprétation des résultats de génotoxicité est importante. Les résultats « erronés » peuvent être :

- Des réponses positives non prédictives d'une activité cancérigène en raison de la faible spécificité des tests réalisés sur cellules de mammifères. En effet, le type de cellule utilisé peut avoir un impact direct sur la nature de la réponse et la déficience en p53 dans de nombreuses lignées cellulaires de rongeurs est un facteur clé dans la faible prédictivité (Fowler et al., 2012). Ces auteurs ont également conclu que les lignées cellulaires de rongeurs (V79, CHO et CHL) étaient plus sensibles à la cytotoxicité et à l'induction de micronoyaux les cellules compétentes p53 et sont donc plus susceptibles de donner des résultats « faussement » positifs.
- Des réponses secondaires dues à des conséquences indirectes et non pas en raison d'une réactivité directe avec l'ADN. En effet, dans les tests de génotoxicité *in vitro* utilisant des cellules de mammifères, certaines conditions et/ou limitations expérimentales peuvent conduire à des résultats «faussement positifs» tels qu'un niveau excessif de toxicité, de fortes variations de pH et/ou d'osmolalité, l'apoptose, le phénomène de chélation (Nesslany, 2016)...
- Des lacunes techniques telle qu'une mauvaise conception d'étude, des erreurs lors de la conduite d'un test ou une évaluation des données inappropriée.

Dans ces conditions contextuelles, concernant le mode d'action génotoxique du CCl₄, il a été jugé pertinent d'utiliser une approche de type poids de la preuve (WoE) pour déterminer le mode d'action génotoxique du CCl₄. Ainsi, chaque méthode d'essai individuellement s'est vue attribuer un poids selon sa contribution à la preuve globale (différents types de catégories de preuves ou de preuves sont pondérés avant d'être combinés dans une évaluation WoE).

Quatre considérations ont été appliquées:

- a) Les différents types d'essais ont des poids différents :

Les tests mesurant les mutations et les dommages chromosomiques sont considérés comme ayant un poids supérieur à celui des "indicateurs" qui mesurent exclusivement les lésions primaires de l'ADN

- b) Le niveau global (robustesse des protocoles et reproductibilité des effets) et la qualité de la preuve dans la catégorie influencent également le poids :

Les études menées sous référentiel BPL et selon les directives de l'OCDE devraient avoir un poids supérieur à celui des études sans ces considérations.

- c) Le nombre de preuves dans une même catégorie influence le poids :

Le fait d'avoir une (ou quelques) réponses divergentes (positives ou négatives) dans une majorité d'études avec des résultats concordants ne doit pas modifier la direction et la force du WoE.

- d) Les tests ayant une plus grande capacité à transposer les résultats chez l'homme ont plus de poids.

Les données provenant des tests *in vivo* (plus prédictifs du danger humain potentiel) doivent porter plus de poids que les données provenant de tests *in vitro* ou réalisés sur des cellules ne provenant pas de mammifères (à l'exception du test d'Ames).

On peut ainsi attribuer des poids selon les 4 catégories suivantes:

- Negligible weight (**Poids négligeable**) : le critère d'évaluation n'est pas lié à un effet néfaste ayant une incidence sur le danger / risque génotoxique ou cancérigène et, en tant que tel, il n'est pas considéré comme une preuve de génotoxicité.
- Low weight (**Faible poids**) : le endpoint est révélateur de dommages primaires à l'ADN qui ne sont pas nécessairement liés à des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse, et le système d'essai a une faible spécificité (qu'on peut traduire ici comme pouvant générer des résultats « faussement » positifs).
- Moderate weight (**Poids modéré**) : le endpoint est potentiellement pertinent dans le processus de cancérogenèse mais il peut être lié à des mécanismes secondaires à seuil (par exemple, clastogènes cytotoxiques, aneugènes) ou le système d'essai présente un taux élevé de « faux » positifs en ce qui concerne la prédiction ou le mode d'action cancérigène.
- High weight (**Poids élevé**) : le endpoint est celui qui a été démontré avec un haut niveau de confiance comme jouant un rôle critique dans le processus de cancérogenèse.

En 2015, l'Agence Européenne des produits Chimiques (ECHA) a également publié un document guide spécifique des « endpoints » à partir duquel les principes de poids de la preuve (WoE) sont compatibles. Les poids suivants ont été attribués selon les 4 catégories (pondération des preuves) : Poids négligeable, faible, modéré et élevé (voir Table No. 1 ci-dessous).

Tableau 1 : Pondération des preuves selon les « endpoints » (ECHA, 2015)

Endpoint	Negligible Weight	Low Weight	Moderate Weight	High Weight
DNA binding (adduct formation) <i>in vitro</i>				
DNA binding (adduct formation) <i>in vivo</i>				
SSB/DSB <i>in vitro</i> (including comet)				
SSB/DSB <i>in vivo</i> (including comet)				
SCEs <i>in vitro</i>				
SCEs <i>in vivo</i>				
Oxidative DNA damage <i>in vitro</i>				
Oxidative DNA Damage <i>in vivo</i> (detection of 8-OHdG adducts)				
DNA repair effects <i>in vitro</i>				
DNA repair effects <i>in vivo</i>				
Micronuclei <i>in vitro</i>				
Micronuclei <i>in vivo</i> (including human)				
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i>				
Chromosomal aberrations <i>in vivo</i> (including human studies)				
Gene mutation in bacteria (Ames' Test)				
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i>				
Gene mutation <i>in vivo</i>				

Selon ces principes, les résultats du test d'Ames et ceux des tests du micronucleus, d'aberrations chromosomiques et de mutation géniques *in vivo* sont considérés comme ayant un poids élevé. Dans la catégorie des tests ayant un poids modéré, on retrouve le test des comètes *in vivo*, l'induction de dommages oxydatifs *in vivo* et les effets sur la réparation de l'ADN *in vivo* ainsi que quelques tests *in vitro* (micronucleus, aberrations chromosomiques et mutations géniques sur cellules de mammifère).

Comme indiqué dans l'overview de l'OCDE (2016)⁵ concernant le poids des tests, « Lors de l'évaluation du potentiel mutagène d'un produit chimique, il faut donner plus de poids à la mesure des changements permanents de l'ADN (c'est-à-dire aux mutations) qu'aux dommages réversibles de l'ADN ».

Par conséquent, les réponses positives dans des tests « indicateurs » (c'est-à-dire la mesure des cassures de l'ADN, des échanges de chromatides sœurs...) sont des signes d'exposition mais sont insuffisants pour déterminer un effet. Pour l'effet, les données de tests mesurant l'induction des mutations géniques ou des altérations chromosomiques stables, en particulier *in vivo* dans les systèmes de mammifères, sont à considérer.

2. Résultats de l'approche WoE pour le CCl₄

Pour réaliser une évaluation WoE pour le CCl₄, l'ensemble des tableaux de résultats compilés par l'US-EPA (2010) a été utilisé (voir Annexe 3). La trame de pondération des preuves telle que proposée par l'ECHA (2015) a été utilisée « endpoint » par « endpoint » et l'ensemble des résultats a été reporté de façon synthétique (test négatif/équivoque/positif) et en utilisant un code couleur (voir Annexe 1). Une synthèse a ensuite été effectuée afin de totaliser les nombres d'essais menant à des résultats négatifs/équivoques/positifs (voir Annexe 2).

RESULTATS DES ESSAIS *IN VITRO* :

Dans les tests d'Ames effectués sur le CCl₄, des doses allant de 5000 à 50 000 ppm ou de 1000 à 10 000 µg/boîte (donc > 5000 µg/boîte correspondant à la dose maximale recommandée dans la ligne directrice de l'OCDE) ont été utilisées. Toutes les souches requises, y compris la souche de *Salmonella typhimurium* TA102 ou une souche d'*Escherichia coli*, ont été utilisées. Sur les 12 tests Ames réalisés sur le CCl₄, un seul a été qualifié de « positif » mais l'augmentation des révertants était non dose-reliée alors que ce paramètre correspond à un des critères de positivité.

Les tests sur cellules de mammifères sur le CCl₄ ont été réalisés jusqu'à des concentrations très élevées dans les essais d'aberrations chromosomiques (jusqu'à 3000 µg/mL), du micronucleus (jusqu'à 1540 µg/mL 8000 µg/mL) et de mutation génique (635 µg/mL). Ainsi, un grand nombre de ces études ont dépassé la concentration de 10 mM (soit 1550 µg/mL pour le CCl₄) qui correspond à la concentration maximale recommandée dans les lignes directrices de l'OCDE correspondantes. Aucune étude évaluant l'induction d'aberrations chromosomiques ou de micronoyaux *in vitro* n'a conduit à des résultats positifs. Le CCl₄ n'a pas induit de mutations géniques *in vitro* dans des cellules de mammifères au cours du test MLA/Tk.

⁵ OECD. 2015. Overview of the Set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and Updates Performed in 2014–2015. Paris (France): Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment Directorate, Health and Safety Publications Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

Il a été démontré que le CCl₄ n'induit pas d'induction de la synthèse non programmée de l'ADN (test UDS) au niveau des hépatocytes, aussi bien dans des essais *in vitro* qu'*in vivo*. Néanmoins, la pertinence et le poids du test UDS sont faibles au regard des connaissances actuelles (à la suite de la décision du Conseil de l'OCDE, la ligne directrice 482 'Toxicologie génétique: dommages et réparations d'ADN, synthèse d'ADN non programmée dans des cellules de mammifères *in vitro*' a été supprimée le 2 avril 2014). Selon Kirkland & Speit (2008), le test UDS *in vivo* s'avère le moins sensibles des tests de seconde intention pour mettre en évidence des produits cancérigènes génotoxiques *in vivo* avec moins de 20 % de sensibilité.

De la même façon, même si les résultats sont négatifs, certains essais d'induction de SCE *in vitro* et un essai d'induction de SCE *in vivo* par le CCl₄ ne contribuent pas à l'évaluation globale du potentiel génotoxique car le mécanisme d'induction et la pertinence biologique de SCE ne sont pas clairs (poids négligeable).

RESULTATS DES ESSAIS *IN VIVO* :

Le CCl₄ a induit des cassures de brins d'ADN *in vivo* de façon significative dans 2 études sur les 13 recensées. Néanmoins, celles-ci pourraient être secondaires à des phénomènes de toxicité signalés ou encore liées à une interférence avec la méthode même d'isolement (méthode de broyage des cellules utilisée par Sasaki et al, 1998). De plus, lorsqu'elle a lieu, la fragmentation d'ADN ne conduit pas à des cassures de chromosomes (concernant les études micronucleus et aberrations chromosomiques, 10 études négatives, 1 équivoque et 1 menant à des résultats positifs au niveau du foie à une dose présentant des signes de toxicité- voir ci-dessous). Ces résultats ont donc été attribués comme étant à faible poids.

A l'exception d'une étude d'aberrations chromosomiques réalisée à la dose de 1600 mg/kg, toutes les études du micronucleus et d'aberrations chromosomiques *in vivo* sur moelle osseuse ont utilisé une dose supérieure ou égale à 2000 mg/kg pc/j qui correspond à la dose maximale recommandée dans les lignes directrices de l'OCDE correspondantes, y compris dans 2 études réalisées par voie IP. Ainsi, quasiment toutes les études *in vivo* du micronucleus et d'aberrations chromosomiques sur le CCl₄ ont atteint ou dépassé la dose supérieure requise. Au cours de 7 études réalisées au niveau de la moelle osseuse chez la souris ou chez le rat (2 tests d'aberrations chromosomiques et 5 tests du micronucleus), le CCl₄ n'a induit aucune augmentation significative.

Sur les 5 études micronoyaux et l'étude d'aberrations chromosomiques effectuées au niveau du foie comme organe cible, seule 1 étude micronoyaux a donné un résultat positif mais celui-ci a été obtenu à une dose forte induisant de la toxicité mettant en question la pertinence biologique de cet effet.

La pertinence de résultats *in vivo* négatifs doit être associée à la garantie d'une exposition suffisante de l'organe cible investigué. La question subsidiaire dans ce cas est : La moelle osseuse et le foie sont-ils des organes exposés?

D'après Toxnet⁶, le CCl₄ est facilement absorbé par inhalation, par le tractus gastro-intestinal et par la peau. Le rapport de l'EPA (2008) confirme que le CCl₄ est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal chez l'homme et l'animal. Il existe des preuves d'absorption gastro-intestinale chez l'homme sur la base de rapports de toxicité suite à des incidents d'intoxication. Chez le rat Sprague-Dawley mâle recevant des doses en bolus par gavage de 17,5 et 179 mg/kg, des concentrations maximales de CCl₄ ont été détectées dans le foie après 1 minute et dans le sang en 10 minutes. Une dose orale d'environ 3200 mg/kg a permis d'atteindre une concentration sanguine maximale en environ 2 heures chez le rat. L'absorption totale a été réduite de 37 à 56% lorsque les mêmes doses ont été administrées par perfusion sur une période de 2 heures. En effet, selon l'évaluation de l'CIRC (1999), la différence entre une administration orale de CCl₄ en bolus (la voie d'administration utilisée pour la plupart des études toxicologiques et mécanistiques) et une exposition par inhalation (la voie la plus représentative de l'exposition humaine), a été abordée par Sanzgiri et al. (1995), qui ont étudié la cinétique du CCl₄ chez le rat (*i*) à la dose de 100 et 1000 ppm par inhalation pendant 2 h (équivalent à une dose administrée par voie systémique de 17,5 et 179 mg/kg pc), (*ii*) sous la forme d'une émulsion en bolus de 17,5 et 179 mg/kg pc administrée par gavage et (*iii*) en émulsion de perfusion gastrique à ces mêmes doses sur une période de 2 h. La concentration de CCl₄ dans le sang artériel a été considérablement plus élevée dans les groupes administrés en bolus. Dans les groupes administrés aux doses de 17,5 et 179 mg/kg pc, les valeurs C_{max} et AUC étaient respectivement d'environ 6 et 16 fois plus élevées dans les groupes administrés en bolus que les groupes exposés par inhalation.

Toujours d'après le rapport de l'EPA (2008), chez des rats recevant des doses équivalentes par inhalation ou par gavage en bolus, les demi-vies d'élimination (t_{1/2}) sont d'environ 4 heures.

D'après le rapport de l'EPA (2008), les paramètres d'élimination qui ont été évalués pendant une période de 24 heures chez des rats exposés par gavage au [¹⁴C]-tétrachlorure à des doses allant de 15 à 4000 mg/kg, ont montré que :

- À la dose faible de 15 mg/kg, 19% de la dose administrée ont été éliminés dans l'air exhalé en tant que composé parent, 28% comme CO₂ (représentant 83% des métabolites) et 0,11% sous forme de chloroforme (0,3% des métabolites). 2,9% des métabolites sont restés liés au foie, tandis que 2,7% ont été excrétés dans les urines et 11% dans les fécès,
- Aux doses ≥600 mg/kg, plus de 76% de la dose administrée ont été exhalés en tant que composé parent, moins de 2% a été exhalé comme CO₂ (représentant 50 à 60% des métabolites) et moins de 0,40% sous forme de chloroforme (11 à 19% des métabolites); 2-4% des métabolites restent liés au foie, tandis que 3 à 9% des métabolites ont été excrétés dans les urines et 7 à 30% dans les fécès. Le pic d'élimination a lieu entre 15 et 45 minutes, dans les 2 heures, et légèrement après 2 heures respectivement pour le CO₂, le composé parent et le chloroforme.

⁶ <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/?./temp/~9W2HDM:3>

Ainsi, le CCl₄ administré par voie orale chez le rongeur est bien absorbé puis excrété en partie dans les urines ou exhalé sous forme de composé parent ou de métabolites. Ces données démontrent une exposition systémique et indiquent que la moelle osseuse est un tissu fort probablement bien exposé au CCl₄ chez les rongeurs traités par voie orale.

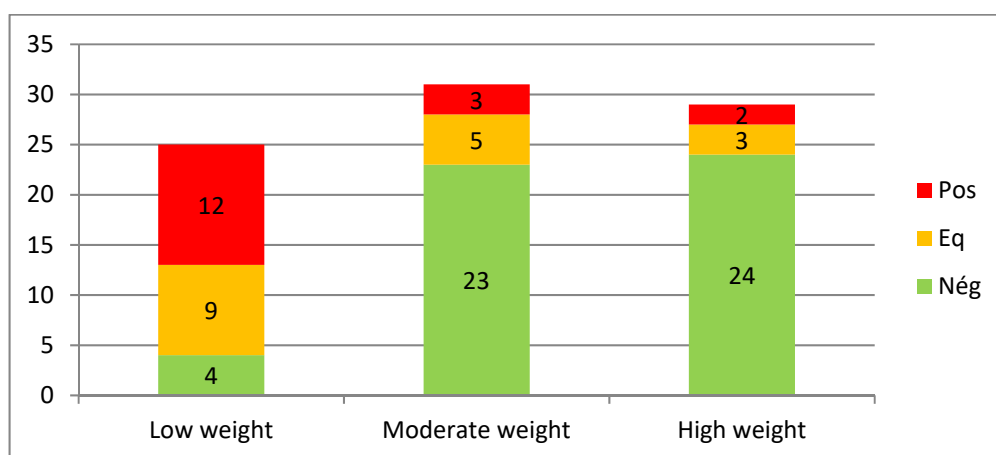
Enfin, le CCl₄ n'a pas induit de mutations géniques *in vivo* au cours de 5 études réalisées sur animaux transgéniques qui ont particulièrement ciblé le foie.

3. Conclusions de l'analyse WoE pour le mode d'action génotoxique du CCl₄

Ainsi, les méthodes d'essai identifiées comme « *Low Weight* » ont généré la plus forte fréquence de réponses positives (12 sur 25) mais la grande majorité de celles-ci a présenté de la toxicité susceptible de produire des interférences donc des résultats « faussement » positifs. Les réponses positives ont été obtenues exclusivement dans des tests d'altération primaire de l'ADN connus comme étant susceptibles aux interférences liées à des niveaux de doses excessifs.

Parallèlement, une très forte minorité d'études de poids modéré (3 sur 31) ou de poids élevé (2 sur 29) a donné des résultats positifs pour le CCl₄ alors que ces études ont montré la présence de toxicité en parallèle. En particulier, il existe des preuves substantielles, dans les tests d'Ames et dans les tests *in vivo* sur animaux transgéniques, que le CCl₄ n'induit pas de mutation génique. De la même façon, la quasi-totalité des essais mesurant les mutations chromosomiques (micronucleus et aberrations chromosomiques) *in vivo* donne des résultats négatifs.

Figure 1 : Synthèse du nombre d'études réalisées sur le CCl₄ menant à des résultats positifs (rouge), équivoques (orange) et négatifs en fonction de la catégorie de poids



L'absence de CCl₄ à induire des réponses dans des systèmes d'essai bien validés avec des protocoles expérimentaux robustes caractéristiques des cancérogènes génotoxiques ne permet pas de conclure que le CCl₄ pourrait agir par un mode d'action génotoxique direct.

L'analyse du mode d'action cancérigène du CCl₄ par l'approche WoE tend à démontrer un mécanisme indirect de génotoxicité (lorsqu'elle se produit).

Par ailleurs, le tableau 2 ci-dessous compare les caractéristiques retrouvées avec des cancérigènes génotoxiques confirmés (Bolt et al., 2004; Petkov et al., 2015) et les profils d'activité génotoxique observés pour le CCl₄. Cette compilation sous format tabulaire démontre clairement qu'il n'y a aucune concordance entre les deux ensembles de caractéristiques ce qui tend à confirmer un mode d'action indirect et non pas un mode d'action génotoxique direct.

Tableau 2 : Caractéristiques des cancérigènes génotoxiques avérés vs profil d'activité génotoxique du CCl₄

Caractéristiques	Cancérigènes avec un mode d'action génotoxique démontré	Données expérimentale obtenues pour le CCl ₄
Profil de réponse dans les essais de génotoxicité	Effets les positifs au travers plusieurs endpoints prédictifs clés (c'est-à-dire mutation génique, aberrations chromosomiques, aneuploïdie), à la fois <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Aucune augmentation significative de l'induction de mutations géniques ou chromosomiques <i>in vivo</i> . Les quelques rares résultats équivoques ou positifs (ex. test comètes) sont liés à l'utilisation de doses entraînant l'apparition de phénomènes toxiques.
Relation Structure/Activité	Positif pour les alertes structurelles associées à l'activité génétique	Aucune alerte structurelle pour le CCl ₄ suggérant une génotoxicité (cf Annexe 4) Seule une alerte de cancérogenèse non-génotoxique a été notée du fait de la présence du groupement alkyl halides
Fixation à l'ADN	La substance ou le produit de dégradation est généralement électrophile et présente une liaison directe avec l'ADN	La quasi-totalité des essais de DNA binding <i>in vivo</i> a donné des résultats équivoques ou significatifs mais toutes ces études ont été réalisées à des doses présentant de la toxicité. De plus, selon les résultats obtenus dans Toxtree, aucune alerte concernant le potentiel de liaison avec l'ADN n'a été identifiée
Consistance	Les résultats des tests sont très reproductibles à la fois <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	La grande majorité des endpoints « Moderate et High Weight » a donné des résultats négatifs. On observe quelques réponses contradictoires et/ou non reproductibles dans un même test ou une même catégorie de tests à la fois <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .
Réponse cinétique	Les réponses sont dose-dépendantes sur une large gamme de niveaux d'exposition	Les réponses positives ne montrent pas d'augmentation dose-dépendante et sont très souvent obtenues à des doses très élevées
Susceptibilité vis-à-vis de facteurs confondants (par exemple, cytotoxicité)	Les réponses se retrouvent habituellement à des niveaux d'exposition non toxiques	Les réponses positives ou équivoques sont généralement associées à des signes de toxicité manifeste

Domage oxydatif

L'hypothèse d'un mode d'action oxydant de CCl₄ (direct et/ou indirect) conduisant à des effets génotoxiques a été proposée, ce qui apparaît plausible étant donnée que le CCl₄ est connu pour induire des phénomènes de lipo-péroxydation à des concentrations élevées.

Les mesures des effets oxydatifs peuvent être pondérées d'une manière similaire à celle appliquée aux mesures de génotoxicité.

Dans ces circonstances, il est intéressant de noter qu'une seule étude a réellement étudié la production d'adduits de type 8oxodG et que les résultats équivoques sont attribués à la formation de 8oxodG secondaire à la peroxydation lipidique à la forte concentration de 615 µg/mL (Beddowes et al., 2003). Dans cette même étude, les adduits de type 3-(2-désoxy-β-d-érythro-pentofuranosyl)-pyrimido [1,2-a] purin-10(3H)-one (=M1dG) ont également été mesurés alors que ceux-ci sont formés secondairement à la lipo-péroxydation. En effet, il a été démontré que M1dG est l'adduit à l'ADN le plus abondant formé à partir du malondialdéhyde, lui-même produit de la peroxydation lipidique. M1dG est mutagène dans les cellules bactériennes et mammifères et est réparé via le système de réparation d'excision de nucléotides (Wauchope et al, 2015).

Ainsi, il existe quelques données publiées sur l'induction d'adduits de type 8-OHdG (qui est un marqueur d'oxydation de l'ADN très pertinent) qui serait issue d'une interférence liée à des phénomènes de lipo-péroxydation, ce qui tend à être démontré par la formation parallèle de l'adduit M1dG directement formé à partir du malondialdéhyde qui est précisément un sous-produit de la lipo-péroxydation.

Dans ces conditions, les études dans les cellules de mammifères ayant produit des résultats contradictoires dont certains résultats positifs observés uniquement à des doses élevées, pourraient être attribuables à la production indirecte d'espèces réactives de l'O₂ et par conséquent ne sont pas prédictives d'induction de stress oxydatif *in vivo*.

La génotoxicité suite au stress oxydatif est souvent une réponse secondaire à la toxicité et globalement, il n'y a pas de WoE fort que le CCl₄ produise des dommages oxydatifs directs à l'ADN mais plutôt secondaires/indirects liés à des phénomènes de lipo-péroxydation.

L'ensemble des données disponibles et leur pondération selon l'approche WoE n'apporte pas de fortes preuves de la génotoxicité et des capacités de stress oxydatif direct du CCl₄. L'examen critique de l'ensemble de données amène à la conclusion que le CCl₄ n'agit probablement pas selon un mode d'action génotoxique direct et que les dommages oxydatifs à l'ADN sont plutôt secondaires/indirects aux phénomènes de lipo-péroxydation.

4. Conclusion

Etant donnée la très importante base de données publiées, la multiplicité des systèmes d'essai et leur différent niveau d'organisation (bactéries, cellules, animal), les différents paramètres biologiques mesurés (endpoints) et les diverses conditions expérimentales (méthode et niveau d'exposition)..., il a été jugé plus pertinent d'évaluer l'ensemble de ces résultats selon une approche de type Weight of Evidence (WoE).

Une très forte majorité d'études de génotoxicité et de mutagenèse de poids modéré (28 sur 31) ou de poids élevé (27 sur 29) a donné des résultats négatifs pour le CCl₄. En particulier, les tests d'Ames et les tests *in vivo* du micronucleus et d'aberrations chromosomiques ainsi que les tests sur animaux transgéniques permettent de conclure que le CCl₄ n'induit ni des mutations géniques *in vitro* et *in vivo*, ni des mutations chromosomiques *in vivo*.

La plus forte fréquence de réponses positives (12 sur 25) l'a été pour les méthodes d'essai identifiées comme « Low Weight » alors que la grande majorité de ces études ont parallèlement montré la présence de toxicité susceptible de produire des interférences donc des résultats « faussement » positifs. En outre, les réponses positives ont été obtenues exclusivement dans des tests d'altération primaire de l'ADN connus comme étant susceptibles aux interférences liées à des niveaux de doses excessifs. Enfin, l'approche WoE n'apporte pas de preuves des capacités de stress oxydatif direct du CCl₄.

Par ailleurs, la comparaison des caractéristiques des cancérogènes génotoxiques avérés avec le profil d'activité génotoxique du CCl₄ démontre qu'il n'y a aucune concordance entre les deux ensembles de caractéristiques ce qui tend à confirmer un mode d'action indirect et non pas un mode d'action génotoxique direct.

L'examen critique de l'ensemble des données amène à la conclusion que le CCl₄ n'agit probablement pas selon un mode d'action génotoxique direct et que les dommages oxydatifs à l'ADN sont plutôt secondaires/indirects aux phénomènes de lipopéroxydation.

Dr Fabrice Nessler

10 mai 2017

Références

Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett.* 2004 Jun 15;151(1):29-41.

ECHA (2015)

Fowler P, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhler S, Carmichael P. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res.* 2012 Feb 18;742(1-2):11-25

Honma M, Hayashi M. Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 2011 Jun;52(5):373-84

CIRC monograph Volume 71 (1999). Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. <http://monographs.CIRC.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71.pdf>

Kirkland D, Speit G. (2008) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutat Res.* Jul 31;654(2):114-32.

Nesslany F. The current limitations of *in vitro* genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation. *Food Chem Toxicol.* 2016 Aug 31

Petkov PI, Patlewicz G, Schultz TW, Honma M, Todorov M, Kotov S, Dimitrov SD, Donner EM, Mekenyan OG. A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015 Jun;72(1):17-25. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.03.003.

U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of Carbon tetrachloride (CAS No. 56-23-5) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). March 2010

Wauchope OR, Beavers WN, Galligan JJ, Mitchener MM, Kingsley PJ, and Marnett LJ. Nuclear Oxidation of a Major Peroxidation DNA Adduct, M1dG, in the Genome. *Chem Res Toxicol.* 2015 Dec 21; 28(12):2334-42

World Health Organization (1999). Carbon tetrachloride. Environmental health criteria 208.

Annexe 1: Attribution des poids « Endpoint » par « Endpoint »

Endpoint	Negligible Weight		Low Weight		Moderate Weight	High Weight	Commentaires	
DNA binding (adduct) <i>in vitro</i>			4	1			<p>Table 4-10D</p> <p>Cinq études de fixation à l'ADN réalisées soit directement sur de l'ADN de thymus de veau (à des doses allant de 5,6 µg/mL à 154 µg/mL) ou sur des hépatocytes isolées de diverses origines (à des doses allant de 31 µg/mL à 615 µg/mL) ont été réalisées et ont conduit à des résultats positifs à équivoques.</p> <p>Il est intéressant de noter qu'une étude visant à mesurer spécifiquement les adduits de type 8oxodG et que les résultats équivoques ont été attribués à la formation de 8oxodG secondaire à la peroxydation lipidique à la forte concentration de 615 µg/mL (Beddowes et al., 2003). Dans cette même étude, les adduits de type M1dG ont également été mesurés alors que ceux-ci sont formés secondairement à la lipo-péroxydation. En effet, il a été démontré que M1dG est l'adduit à l'ADN le plus abondant formé à partir du malondialdéhyde, produit de la peroxydation lipidique. M1dG est mutagène</p>	
DNA binding (adduct) <i>in vivo</i>			1	4	10		<p>Table 4-11F</p> <p>L'ensemble des essais (majoritairement réalisé au niveau du foie) a conduit à des résultats équivoques ou positifs mais à des doses présentant de la</p>	
SSB/DSB <i>in vitro</i> (including comet)							Pas de donnée.	
SSB/DSB <i>in vivo</i> (including comet)					9	2	2	<p>Table 4-11B</p> <p>Sur 13 études de cassures de brins d'ADN (élution alcaline ou test des comètes) réalisées au niveau du foie chez la souris ou chez le rat, à des doses allant de 80 mg/kg à 4000 mg/kg (voie i.p.), 9 ont conduit à des résultats négatifs, 2 à des résultats équivoques et 2 à des résultats positifs mais à des doses présentant de la toxicité (Gans and Korson, 1984 ; Sasaki et al., 1998). La méthode « d'isolement » des noyaux dans les essais de Sasaki et al (1998) a été largement critiquée car elle utilise une méthode mécanique permettant de récupérer un broyat de noyaux cellulaires sur lequel est réalisé le test des comètes sans que parallèlement une estimation</p>
SCEs <i>in vitro</i>	3	1					<p>Table 4-10B</p>	

						<p>Sur 4 études, une seule a conduit à des résultats positifs (Sivikova et al., 2001).</p> <p>Néanmoins, l'induction d'échanges de chromatides sœurs <i>in vitro</i> est considérée comme ayant peu de poids. En effet, si cet événement peut indiquer des remaniements chromosomiques principalement lors</p>
SCEs <i>in vivo</i>	1					<p>Table 4-11C</p> <p>Une seule étude réalisée sur hépatocytes de rats F344 mâles traités jusqu'à la dose maximale de 1600 mg/kg par voie orale a montré des résultats négatifs (Sawada et al., 1991). Comme indiqué ci-dessus, l'induction</p>
Oxidative DNA damage <i>in vitro</i>		1				<p>Table 4-10D</p> <p>Une seule étude réalisée sur hépatocytes isolés de rats Wistar femelles a montré des résultats équivoques de formation d'adduits de type 8oxodG à la dose forte de 615 µg/ml, présentant par ailleurs de la cytotoxicité</p>
Oxidative DNA Damage <i>in vivo</i> (detection of 8-OHdG)						Pas de donnée
DNA repair effects <i>in vitro</i>		3	1			<p>Table 4-8B</p> <p>Sur 4 références bibliographiques évaluant la réparation de l'ADN sur des systèmes bactériens, une seule a montré des résultats positifs dans certaines conditions expérimentales (De Flava et al. 1984)</p>
DNA repair effects <i>in vivo</i>			6	1	1	<p>Table 4-11C</p> <p>Sur 8 études de synthèse non programmée de l'ADN <i>in vivo</i> réalisées au niveau des hépatocytes de rat ou de souris, à des doses allant de 4000 mg/kg à 100 mg/kg (voie orale), une seule a conduit à des résultats positifs (Craddock and Henderson, 1978). Néanmoins, au cours de cet essai, l'hydroxyurée a été directement injecté chez les animaux traités (ainsi que la [3H]-thymidine) et une toxicité a été notée. Il faut souligner que l'hydroxyurée utilisée pour stopper la synthèse <i>de novo</i> d'ADN est elle-même un agent cancérigène génotoxique, qui induit de la réparation de l'ADN de façon dose-dépendant dans le test UDS (Rossberger S, Andrae U. DNA repair synthesis induced by N-hydroxyurea, acetohydroxamic acid, and</p>
Micronuclei <i>in vitro</i>			3	2		<p>Table 4-10A</p>

										<p>Sur 5 études réalisées sur divers types cellulaires, 2 ont conduit à des résultats significatifs (cellules h2E1 et MCL-5) mais à des concentrations présentant de la cytotoxicité, et avec principalement des augmentations du nombre de micronoyaux kinétochore+ (aneuploïdie) à la concentration inférieure (308 µg/mL) et une augmentation des micronoyaux kinétochore- à la concentration la plus élevée (1538 µg/mL) (Doherty et al., 1996). Des essais spécifiques sur la perturbation du fuseau mitotique/aneuploïdie ont été réalisés et ont conduit à des résultats significatifs (dose très élevée de</p>
Micronuclei <i>in vivo</i> (including human studies)					5					<p>Table 4-11A</p> <p>Sur 5 études micronucleus réalisées au niveau de la moelle osseuse chez la souris, à des doses allant de 2000 à 3000 mg/kg, aucune n'a conduit à des résultats positifs. Deux études réalisées chez la souris CD-1, mâle et femelle</p>
					2	1	1			<p>Table 4-11D</p> <p>Quatre études micronoyaux effectuées au niveau du foie ont conduit à des résultats négatifs (2 études), équivoques (1) ou positifs (Van Goethem et al., 1995) mais à une dose maximale de 3200 mg/kg montrant de la toxicité. Les 2 études investiguant l'induction d'aberrations chromosomiques au niveau du foie jusqu'à la dose maximale de 8 000 mg/kg ont été réalisées négatives</p>
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i> ¹					4					<p>Table 4-10A</p> <p>Sur 4 études réalisées sur divers types cellulaires (dont une étude effectuée sur lymphocytes humains), à des concentrations allant de 3000 µg/mL à 0,02 µg/mL, aucune n'a conduit à des résultats positifs.</p>
Chromosomal aberrations <i>in vivo</i> (including human studies)					2					<p>Table 4-11A</p> <p>Sur 2 études d'aberrations chromosomiques réalisées au niveau de la moelle osseuse chez la souris ou chez le rat, à des doses allant de 8000 mg/kg (voie intramusculaire) à 1600 mg/kg (voie orale), aucune n'a conduit à des résultats positifs.</p>
					1					<p>Table 4-11C</p> <p>L'étude d' d'aberrations chromosomiques effectuée au niveau du foie de rats mâles traités à la dose maximale de 1600 mg/kg a conduit à des résultats</p>
Gene mutation in bacteria					9	2	1			<p>Table 4-8A</p>

					Sur 12 références bibliographiques portant sur le test d'Ames (méthode directe, en préincubation utilisant des tubes vissés et exposition en phase gazeuse en dessiccateur), 9 ont donné des résultats négatifs. Un résultat significatif a été obtenu sur <i>S. typhimurium</i> (2460 µg/boîte) mais l'augmentation des révertants était non dose-reliée (Varma et al, 1988) et sur <i>E. coli</i> WP2/bKM101 par exposition de 24h en phase gazeuse à 5.000 ppm
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i> ²			1		Table 4-10B Une étude MLA/Tk réalisée à la concentration maximale de 635 µg/mL s'est révélée négative (Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988)
Gene mutation <i>in vivo</i> ³				5	Table 4-11D Sur 5 études réalisées sur animaux transgéniques (<i>lacI</i> ou <i>lacZ</i>), à des doses allant de 35 mg/kg/j (X5) à 1400 mg/kg (voie orale), aucune n'a conduit à des résultats positifs. Ces résultats négatifs ont d'autant plus de poids que le foie a été l'organe cible étudié dans l'ensemble de ces études

Les 4 publications mesurant la recombinaison intrachromosomale⁷ sur *Saccharomyces cerevisiae* (toutes réalisées par la même équipe) ont mené à des résultats positifs. Néanmoins, ce paramètre est très peu étudié, quelle pertinence pour prédire un effet génotoxique (?) et tous les effets sont reliés à des phénomènes de toxicité (**Table 4-9A**)

Nég	Eq	Pos

⁷ La recombinaison intrachromosomique peut résulter d'un crossing-over entre 2 paires de gènes liés. Entre les répétitions directes elle peut se produire soit en tant qu'événement de conversion génique, qui maintient le nombre exact d'unités répétées, soit comme délétions, ce qui réduit le nombre d'unités répétées. Les conversions géniques sont des événements de recombinaison classiques qui utilisent le mécanisme de recombinaison chromosomique standard. Les délétions spontanées entre les répétitions directes sont généralement indépendantes de RecA chez *E. coli* et de RAD52 dans *S. cerevisiae*. Cette indépendance par rapport aux principales recombinaisons géniques ne signifie pas que les délétions se forment par un processus non-recombinant. Des délétions ont été suggérées par l'échange de chromatides sœurs au niveau de la fourchette de réplication dans un processus indépendant de recA. Le même type d'échanges est proposé comme étant indépendant de RAD52 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les événements dépendants de RAD52 englobent tous les événements qui impliquent les étapes initiales d'une réaction de recombinaison, qui incluent une invasion de brin pour former un hétéroduplex intermédiaire (Klein HL. Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioassays*. 1995 Feb;17(2):147-59).

² Un essai de mutation génique sur *Aspergillus nidulans* 35 a donné des résultats équivoques en absence d'activation métabolique avec présence de toxicité (Gualandi, 1984). Cf Tableau 4-9B

³ Un test de mutagenèse sur drosophiles a donné des résultats négatifs (Fouerean, 1994). Cf Tableau 4-9B

Annexe 2: Synthèse des attributions des poids « Endpoint » par « Endpoint »

End point	Negligible Weight	Low Weight			Moderate Weight			High Weight		
DNA binding (adduct) <i>in vitro</i>		4		1						
DNA binding (adduct) <i>in vivo</i>		1	4	10						
SSB/DSB <i>in vivo</i> (including comet)					9	2	2			
SCEs <i>in vitro</i>	3	1								
SCEs <i>in vivo</i>	1									
Oxidative DNA damage <i>in vitro</i>			1							
DNA repair effects <i>in vitro</i>		3	1							
DNA repair effects <i>in vivo</i>					6	1	1			
Micronuclei <i>in vitro</i>					3	2				
Micronuclei and chromosomal aberrations <i>in vivo</i> on bone marrow								7		
Micronuclei and chromosomal aberrations <i>in vivo</i> on the liver								3	1	1
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i>						4				
Gene mutation in bacteria								9	2	1
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i>						1				
Gene mutation <i>in vivo</i>								5		
TOTAL		4	9	12	23	5	3	24	3	2

T : Présence de toxicité

Nég	Eq	Pos

Annexe 3: Résultats sous forme tabulaire des essais de génotoxicité et de mutagenèse obtenus sur le CCl₄ (d'après U.S. EPA, 2010)**Table 4-8A. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in prokaryotic organisms**

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a		Dose ^c		Reference
			Without activation	With activation ^b			
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535	Reverse mutation	Plate incorporation assay	–	–	10,000 µg/plate		McCann et al., 1975
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538	Reverse mutation	Plate incorporation assay	– (T)	– (T)	10,000 µg/plate DMSO ^d	in	De Flora, 1981
<i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100	Reverse mutation	Plate incorporation assay	–	–	1,000 µg/plate DMSO ^d	in	Brams et al., 1987
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	Reverse mutation	Plate incorporation assay	+d	+d	2,460 µg/plate methanol	in	Varma et al., 1988
<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1538	Reverse mutation	Preincubation assay using capped tubes	–	–	1,230 µg/mL		Uehleke et al., 1977
<i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537	Reverse mutation	Preincubation assay using capped tubes	–	–	3,333 µg/plate in DMSO		Zeiger et al., 1988
<i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA1535	Reverse mutation	Preincubation assay using capped tubes	–	–	3,333 µg/plate in DMSO		Zeiger et al., 1988
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538	Reverse mutation	Gas phase exposure in dessicator for 7–10 hrs	–	–	ND		Simmon et al., 1977
<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535	Reverse mutation	Gas phase exposure in dessicator for 7–8 hrs	–	–	ND		Simmon and Tardiff, 1978
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535	Reverse mutation	Gas phase exposure in closed incubation system for 48 hrs	–	–	2,830 µg/plate		Barber et al., 1981
<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537	Reverse mutation	Gas phase exposure in a gas sampling bag for 24 hrs	– (T)	– (T)	50,000 ppm		Araki et al., 2004

<i>S. typhimurium</i> TA98	Reverse mutation	Gas phase exposure in a gas sampling bag for ± 24 hrs	–	10,000 ppm	
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA/pKM101	Reverse mutation	Gas phase exposure in a gas sampling bag for ± 24 hrs	±	10,000 ppm	Araki et al., 2004
<i>E. coli</i> WP2/pKM101	Reverse mutation	Gas phase exposure in a gas sampling bag for ± 24 hrs	+e	5,000 ppm	
<i>E. coli</i> WP2uvrA	Reverse mutation	Gas phase exposure in a desiccator	ND	± 25,000 ppm	Norpoth et al., 1980

Table 4-8B. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in prokaryotic organisms

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a		Dose ^c	Reference
			Without activation	With activation ^b		
<i>S. typhimurium</i> <i>his</i> G46, TA1950	Reverse mutation	Spot test	–	–	4,000 µg/plate	Braun and Schoneich, 1975
<i>S. typhimurium</i> <i>his</i> G46, TA1950	Reverse mutation	Host-mediated assay in male NMRI mice	NA	–	6,400 mg/kg	Braun and Schoneich, 1975
<i>S. typhimurium</i> BA13 and BAL13	Forward mutation	Preincubation assay for L-arabinose resistance (AraR test)	–	–	1,230 µg/plate in DMSO ^d	Roldan-Arjona et al., 1991
<i>S. typhimurium</i> BA13 and BAL13	Forward mutation	Preincubation assay for L-arabinose resistance (AraR test)	±	–	384 µg/plate in DMSO ^d	Roldan-Arjona and Pueyo, 1993
<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002	DNA repair	SOS response indicated by <i>umu</i> gene expression	–	–	5,300 µg/mL	Nakamura et al., 1987
<i>E. coli</i> PQ37	DNA repair	SOS chromotest	–	–	1,540 µg/mL in DMSO	Brams et al., 1987
<i>E. coli</i> WP2, WP67, CM871	Differential DNA repair	Liquid micromethod using sealed plates	+	+	12.5 µg	De Flora et al., 1984
<i>E. coli</i> WP2, WP67, CM871	Differential DNA repair	Preincubation assay in sealed tubes	+	ND	ND	De Flora et al., 1984
<i>E. coli</i> WP2, WP67, CM871	Differential DNA repair	Spot test	–	ND	ND	De Flora et al., 1984
<i>E. coli</i> K-12 343/636,	Differential DNA repair	Preincubation assay	–	–	15,400 µg/mL	Hellmer and Bolcsfoldi, 1992

K-12 343/591

a + = positive, ± = equivocal or weakly positive, – = negative, (T) = toxicity, ND = no data.

b Exogenous metabolic activation used, typically induced rat liver S9.

c Lowest effective dose for positive results, highest dose tested for negative results, ND = no data, NA = not applicable.

d Increase in revertants not dose-related and cytotoxicity not discussed.

e Results similar with or without GSH added to the S9 mix. Positive response is based on the magnitude of response as statistical analyses were not performed.

DMSO = dimethyl sulfoxide; SOS = inducible DNA repair system

Table 4-9A. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in non-mammalian eukaryotic organisms

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a		Dose ^c	Reference
			Without activation	With activation ^b		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	Gene conversion	Preincubation assay in capped tubes	+ (T)	ND	5,230 µg/mL	Callen et al., 1980
<i>S. cerevisiae</i> D7	Mitotic recombination	Preincubation assay in capped tubes	+ (T)	ND	5,230 µg/mL	Callen et al., 1980
<i>S. cerevisiae</i> D7	Reverse mutation	Preincubation assay in capped tubes	+ (T)	ND	5,230 µg/mL	Callen et al., 1980
<i>S. cerevisiae</i> RS112	Intrachromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	ND	2,000 µg/mL	Brennan and Schiestl, 1998
<i>S. cerevisiae</i> RS112	Intrachromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	+ (T)	4,000 µg/mL	Schiestl et al., 1989; Galli and Schiestl, 1998
<i>S. cerevisiae</i> RS112	Interchromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	+ (T)	4,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1998
<i>S. cerevisiae</i> RS112 (arrested in S phase)	Intrachromosomal recombination	Preincubation assay	–	ND	8,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1998
<i>S. cerevisiae</i> RS112 (arrested in S phase)	Interchromosomal recombination	Preincubation assay	–	ND	8,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1998
<i>S. cerevisiae</i> RS112 (arrested in G1 phase)	Intrachromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	ND	5,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1998, 1996
<i>S. cerevisiae</i> RS112 (arrested in G1 phase)	Interchromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	ND	5,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1998, 1996
<i>S. cerevisiae</i> AGY3 (arrested in G2 phase or growing normally)	Intrachromosomal recombination	Preincubation assay	+ (T)	ND	8,000 µg/mL	Galli and Schiestl, 1995
<i>S. cerevisiae</i> D61.M	Aneuploidy	Standard 16-hr incubation or cold-interruption regimen	–	ND	6,400 µg/mL	Whittaker et al., 1989
<i>Aspergillus nidulans</i> P1	Somatic segregation due to cross over and aneuploidy	Plate incorporation assay	+ (T)	ND	0.5%	Gualandi, 1984

Table 4-9B. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in **non-mammalian** eukaryotic organisms

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a		Dose ^c	Reference
			Without activation	With activation ^b		
<i>A. nidulans</i> 35	Forward mutation	Plate incorporation and growth-mediated assays	± (T)	ND	0.5%	Gualandi, 1984
<i>A. nidulans</i> P1	Somatic segregation (positive for aneuploidy; negative for cross over)	Mitotic segregation assay	+ (T)	ND	0.04%	Crebelli et al., 1988
<i>A. nidulans</i> P1	Somatic segregation (positive for aneuploidy; negative for cross over)	Mitotic segregation assay	+ (T)	ND	0.0275%	Benigni et al., 1993
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mutation	Sex-linked recessive lethal assay	–	NA	25,000 ppm in feed or 2,000 ppm injection	Foureman et al., 1994

^a+ = positive, ± = equivocal or weakly positive, – = negative, (T) = toxicity, ND = no data.

^bExogenous metabolic activation not used for most tests because fungi have metabolic capabilities.

^cLowest effective dose for positive results, highest dose tested for negative results, ND = no data, NA = not applicable.

Table 4-10A. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian cells in vitro

Test system	Endpoint	Test conditions		Results ^a		Dose ^c	Reference
		Without activation	With activation ^b				
Human lymphocytes G0	peripheral	Chromosomal aberrations	30-Min incubation in sealed tubes	– (T)	– (T)	76 µg/mL	Garry et al., 1990
Lamb lymphocytes	peripheral	Chromosomal aberrations	48-Hr incubation	–	ND	16 µg/mL	Sivikova et al., 2001
Chinese hamster cells	ovary	Chromosomal aberrations	Assay conducted in sealed flasks	–	–	3,000 µg/mL in DMSO	Loveday et al., 1990
RL1 cultured cell line derived from rat liver	cell line	Chromosomal aberrations	Assay conducted in sealed flasks	–	ND	0.02 µg/mL in DMSO ^d	Dean and Hodson-Walker, 1979
Lamb lymphocytes	peripheral	Micronucleus formation	48-Hr incubation	+	+	8 µg/mL (without activation) 16 µg/mL (with activation)	Sivikova et al., 2001
h2E1 cell line (cDNA for CYP2E1)		Micronucleus formation	Immunofluorescent labeling of kinetochore proteins	+e (T)	ND	308 µg/mL	Doherty et al., 1996
MCL-5 cell line (cDNA for CYPs 1A2, 2A6, 3A4, and 2E1, and epoxide hydrolase)		Micronucleus formation	Immunofluorescent labeling of kinetochore proteins	+e (T)	ND	308 µg/mL	Doherty et al., 1996
AHH-1 cell line (expresses CYP1A1)	cell line	Micronucleus formation	Immunofluorescent labeling of kinetochore proteins	–	ND	1,540 µg/mL	Doherty et al., 1996
Human lymphocytes from two donors		Micronucleus formation	Test conducted in capped tubes	– (2–)d	± (1–)d	1,540 µg/mL	Tafazoli et al., 1998

Table 4-10B. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian cells in vitro

Test system		Endpoint		Test conditions		Results ^a		Dose ^c	Reference
		Without activation				With activation ^b			
Chinese hamster ovary cells		Lagging chromosomes and multipolar spindles	Anaphase analysis	+		ND		8,000 µg/mL	Coutino, 1979
V79 hamster lung cell line	Chinese	Aneuploidy	3-Hr incubation	+		ND		246 µg/mL	Onfelt, 1987
V79 hamster lung cell line	Chinese	c-Mitosis (spindle disturbance)	30-Min incubation	± (T)		ND		492 µg/mL	Onfelt, 1987
Syrian hamster embryo cells		Morphological transformation	Clonal assay	±f		ND		3 µg/mL	Amacher and Zelljadt, 1983
Mouse lymphoma L5178Y cells		Mutation at tk locus	4-Hr incubation	ND		– (T)		635 µg/mL	Wangenheim and Bolcsfoldi, 1988
Chinese hamster ovary cells		Sister chromatid exchange	chromatid	Assay conducted in sealed flasks	– (T)	–		1,490 µg/mL (w/out activation) 2,930 µg/mL(w/ activation) Note: both in DMSO ^f	Loveday et al., 1990
Human lymphocytes G0	peripheral	Sister chromatid exchange	chromatid	30-Min incubation in sealed tubes	– (T)	– (T)		48 µg/mL	Garry et al., 1990
Lamb lymphocytes	peripheral	Sister chromatid exchange	chromatid	48-Hr incubation	+	±		4 µg/mL	Sivikova et al., 2001
RL1 cultured cell line derived from rat liver		Sister chromatid exchange	chromatid	Assay conducted in sealed flasks	–	ND		0.02 µg/mL in DMSO ^d	Dean and Hodson-Walker, 1979
Hepatocytes--primary cultures from four human donors		Unscheduled DNA Synthesis	DNA	21.5–24-hr incubation periods	ND	– (4-) d		154 µg/mL	Butterworth et al., 1989
Hepatocytes isolated from male Sprague-Dawley rats		Unscheduled DNA Synthesis	DNA	Autoradiography and flow cytometric assays	–	ND		154 µg/mL	Selden et al., 1994

Human lymphocytes	Unscheduled DNA Synthesis	DNA	4-Hr autoradiography	culture, –	–	16,000 µg/mL	Perocco and Prodi, 1981
-------------------	---------------------------	-----	----------------------	------------	---	--------------	-------------------------

Table 4-10C. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian cells in vitro

Test system	Endpoint	Test conditions		Results ^a		Dose ^c	Reference
		Without activation		With activation ^b			
Hepatocytes isolated from rats	DNA single strand breaks	Alkaline elution	± (T)	ND	461 µg/mL	Sina et al., 1983	
Mouse lymphoma L5178Y cells	DNA strand breaks	Alkaline elution	ND	+(T)	1,007 µg/mL	Garberg et al., 1988	
Human lymphocytes	DNA breaks	Comet assay	–	–	3,080 µg/mL	Tafazoli et al., 1998	
Hepatocytes isolated from female Wistar rats	DNA single strand breaks	Comet assay	±	ND	154 µg/mL	Beddowes et al., 2003	

Table 4-10D. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian cells in vitro

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference	
		Without activation		With activation^b		
Hepatocytes isolated from female Wistar rats	DNA adduct formation	M1dG adducts formed secondary to lipid peroxidation	±	ND	154 µg/mL	Beddowes et al., 2003
Hepatocytes isolated from female Wistar rats	DNA adduct formation	8oxodG adducts formed secondary to lipid peroxidation	± (T)	ND	615 µg/mL	Beddowes et al., 2003
Calf thymus DNA	DNA binding of radiolabeled chemical	30-Min incubation with rat and mouse microsomes	+	+	5.6 µg/mL	Rocchi et al., 1973
Calf thymus DNA	DNA binding of radiolabeled chemical	60-Min incubation under a N ₂ atmosphere	ND	+	154 µg/mL	DiRenzo et al., 1982
Mouse liver chromatin	DNA binding	2- and 4-hr incubation with binding measured in DNase I-sensitive and -resistant chromatin DNA	ND	+	192 µg/mL	Oruambo and Van Duurer 1987
Hepatocytes isolated from Sprague-Dawley rats	DNA binding	Measured as radioactivity bound to DNA after a 1-hr incubation with microsomes	±	±	31 µg/mL	Castro et al., 1989
Hepatocytes isolated from C3H mice	DNA binding	Measured as radioactivity bound to DNA after a 1-hr incubation with microsomes	±	±	31 µg/mL	Castro et al., 1989
Hepatocytes isolated from Syrian golden hamsters	DNA binding	Measured as radioactivity bound to DNA after a 1-hr incubation with microsomes	±	±	31 µg/mL	Castro et al., 1989

a+ = positive, ± = equivocal or weakly positive, – = negative, (T) = toxicity, ND = no data.

b Exogenous metabolic activation used, typically induced rat liver S9.

c Lowest effective dose for positive results, highest dose tested for negative results, ND = no data, NA = not applicable.

d Results for the individual donors are presented.

e Increase mostly in kinetochore-positive (aneugenic) micronuclei which occurred at the lower (308 µg/mL) concentration, and some increase in kinetochore-negative (clastogenic) micronuclei which was significantly increased at the highest (1538 µg/mL) test concentration.

f Although declared positive by the authors, the induced frequency is well within the currently accepted control range.

Table 4-11A. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Mouse (101/H, male)	Chromosomal aberrations in bone marrow	Metaphase analysis of samples collected 6–48 hrs after dosing	– (T)	8,000 mg/kg injected i.m.	Lil'p, 1982
Rat (Sprague-Dawley, male)	Chromosomal aberrations in bone marrow	Metaphase analyses from animals sacrificed 24 hr after dosing	–	1,600 mg/mL by oral gavage	Rossi et al., 1988
Mouse (BDF1, male)	Micronucleus formation in bone marrow	Analyzed polychromatic erythrocytes from specimens prepared 24 hrs after dosing	– (T)	2,000 mg/kg by oral gavage (2×)	Morita et al., 1997; Suzuki et al., 1997
Mouse (BDF1, male)	Micronucleus formation in bone marrow	Analyzed polychromatic erythrocytes from specimens prepared 24 hrs after dosing	– (T)	2,000 mg/kg by oral gavage	Morita et al., 1997; Suzuki et al., 1997
Mouse (BDF1, male)	Micronucleus formation in peripheral blood	Analyzed reticulocytes from specimens prepared 24–72 hrs after dosing	–	3,000 mg/kg by i.p. injection	Suzuki et al., 1997
Mouse (CD-1, male)	Micronucleus formation in peripheral blood	Analyzed reticulocytes from specimens prepared 24–72 hrs after dosing	– d	2,000 mg/kg by oral gavage in olive oil	Morita et al., 1997
Mouse (CD-1, male and female)	Micronucleus formation in bone marrow	Analyzed polychromatic erythrocytes from femur bone marrow of mice killed 24 or 48 hrs after dosing	– (T)	3,000 mg/kg i.p. in olive oil	Crebelli et al., 1999

Table 4-11B. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Mouse (CD-1, male)	DNA damage in stomach, kidney, bladder, lung, brain, and bone marrow	Comet assay on stomach, kidney, bladder, lung, brain, and bone marrow obtained 0, 3, or 24 hrs after dosing	–	2,000 mg/kg by oral gavage	Sasaki et al., 1998
Rat (F344, male)	DNA breakage	Comet assay on peripheral blood cells	± (T)	120 mg/kg by i.p. injection	Kadiiska et al., 2005
Mouse (NMRI, male and female)	DNA strand breaks in liver	Alkaline elution of sample collected 4 hrs after dosing	–	4,000 mg/kg by oral gavage	Schwarz et al., 1979
Rat (Wistar, female, partially hepatectomized)	DNA damage in liver	Caffeine elution 4 or 24 hrs after dosing	–	800 mg/kg by oral gavage in corn oil	Stewart, 1981
Rat (F344, male)	DNA strand breaks in liver	Alkaline elution on primary hepatocytes isolated from rats sacrificed 2–48 hrs after dosing	–	400 mg/kg by oral gavage in corn oil	Bermudez et al., 1982
Rat (strain and sex not specified)	DNA breaks in liver	Alkaline elution on liver nuclei obtained 1 hr after dosing	–	4 mg/kg by i.p. injection	Kitta et al., 1982
Rat (BD-VI, male)	DNA strand breaks in liver	Alkaline elution on primary hepatocytes isolated from rats sacrificed 4 hrs after dosing	– (T)	4,000 mg/kg by i.p. injection	Barbin et al., 1983
Rat (Sprague-Dawley, male)	DNA damage in liver	Viscometric assay on rats sacrificed 2 hrs after dosing	–	200 mg/kg by i.p. injection	Brambilla et al., 1983
Mouse (CD-1, male)	DNA strand breaks in liver	Alkaline elution	+ (T)	80 mg/kg by oral gavage in corn oil	Gans and Korson, 1984
Rat (Sprague-Dawley CD stain, female)	DNA strand breaks in liver	Alkaline elution on primary hepatocytes isolated from rats dosed 21 and 4 hrs before sacrifice	–	1,050 mg/kg by oral gavage in corn oil (2x)	Kitchin and Brown, 1989
Rat (Sprague-Dawley, male)	DNA strand breaks in liver	DNA strand breaks in hepatocytes were measured by a fluorometric assay for DNA unwinding 1 hr after dosing	–	160 mg/kg in corn oil by i.p.	Ikegwonu and Mehendale, 1991
Rat (Wistar, male)	DNA strand breaks in liver	Breaks in DNA of nonparenchymal cells identified by in situ nick translation 12–96 hrs after dosing	± (T) e	1,600 mg/kg i.p. in olive oil	Nakamura and Hotchi, 1992
Rat (Wistar, male)	DNA strand breaks in liver	Breaks in DNA of nonparenchymal cells identified by in situ nick translation after dosing 2 times/wk until wk 12 with sacrifices at 3, 6, 9, 12, 15, and 18 wks	± (T) e	2,000 mg/kg (24 times)	

Mouse (CD-1, male)	DNA damage in liver	Comet assay on liver obtained 0, 3, or 24 hrs after dosing	+ (T)	1,000 mg/kg by oral gavage	Sasaki et al., 1998
Rat (Wistar, male)	DNA fragmentation in liver	TUNEL ^f assay on rats sacrificed 1 d after the second dose	+ (T)		
Rat (Wistar, male)	DNA fragmentation in liver	TUNEL ^f assay on rats sacrificed at 10, 15, 20, 25, and 30 hrs after dosing	+ (T)		

Table 4-11C. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system		Endpoint	Test conditions		Results ^a	Dose ^c	Reference
Rat (Wistar, female)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Animals injected with hydroxyurea (to stop de novo DNA synthesis) and then [3H]-thymidine 2 hrs after dosing	–	4,000 mg/kg by oral gavage in liquid paraffin	Craddock and Henderson, 1978
Rat (Wistar, female)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Animals injected with hydroxyurea (to stop de novo DNA synthesis) and then [3H]-thymidine 17 hrs after dosing	+ (T)	4,000 mg/kg by oral gavage in liquid paraffin	Craddock and Henderson, 1978
Rat (F344, male)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Rats sacrificed 2 hrs after dosing; primary hepatocytes isolated by liver perfusion and cultured with [3H]-thymidine	–	100 mg/kg by oral gavage in corn oil	Mirsalis and Butterworth, 1980
Rat (F344, male)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Rats sacrificed 2–48 hrs after dosing; primary hepatocytes isolated by liver perfusion and cultured with [3H]-thymidine	– (T)	400 mg/kg by oral gavage in corn oil	Mirsalis et al., 1982
Mouse (B6C3F1, male)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Rats sacrificed 12 hrs after dosing; primary hepatocytes isolated by liver perfusion and cultured with [3H]-thymidine	– (T)	100 mg/kg by oral gavage	Madle et al., 1994; Mirsalis, 1987
Mouse (B6C3F1, female)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Rats sacrificed 12 hrs after dosing; primary hepatocytes isolated by liver perfusion and cultured with [3H]-thymidine	– (T)	100 mg/kg by oral gavage	Mirsalis, 1987; Madle et al., 1994
Mouse (CD-1, male)		Unscheduled synthesis in liver	DNA	Mice sacrificed 3–48 hrs after dosing; liver cells isolated and analyzed by autoradiography	– (T)	100 mg/kg by oral gavage in corn oil	Doolittle et al., 1987
Rat (Sprague-Dawley, male)		Unscheduled synthesis	DNA	Unscheduled DNA synthesis by labeling of DNA in hydroxyurea-treated animals 1 hr after dosing	±	160 mg/kg in corn oil by i.p.	Ikegwuonu and Mehendale, 1991
Mouse (DC-1, male)		Chromosomal fragments and bridges in liver		Anaphase analysis of squash preparations prepared 72 hrs	–	8,000 mg/kg	Curtis and Tilley, 1968

after dosing

Rat (F344, male)	Chromosomal aberrations in liver	Analyzed primary hepatocytes cultured for 48 hrs from rats sacrificed 0–72 hrs after dosing	–	1,600 mg/kg by oral gavage in corn oil	Sawada et al., 1991
Rat (F344, male)	Sister chromatid exchange in liver	Analyzed primary hepatocytes cultured for 48 hrs from rats sacrificed 0–72 hrs after dosing	–	1,600 mg/kg by oral gavage in corn oil	Sawada et al., 1991

Table 4-11D. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Rat (F344, male)	Micronucleus formation in liver	Analyzed primary hepatocytes cultured for 48 hrs from rats sacrificed 0–72 hrs after dosing	–	1,600 mg/kg by oral gavage in corn oil	Sawada et al., 1991
Rat (Wistar, male)	Micronucleus formation in liver	Analyzed primary hepatocytes harvested 72 hrs after dosing, an optimal time to detect micronuclei.	± (T)	3,200 mg/kg by oral gavage in corn oil	Van Goethem et al., 1993
Rat (Wistar, male)	Micronucleus formation in liver	Analyzed primary hepatocytes harvested 72 hrs after dosing, an optimal time to detect micronuclei.	+ (T) g	3,200 mg/kg by oral gavage in corn oil	Van Goethem et al., 1995
Mouse (CBAx575BL/6, male)	Micronucleus formation and ploidy levels in liver	Analyzed primary hepatocytes from rats sacrificed 5 d after dosing and compared with a partially hepatectomized control.	–	15-Min inhalation at 0.05–0.1 mL/5 L	Uryvaeva and Delone, 1995
Mouse (B6C3F1, <i>lacI</i> transgenic; Big Blue™, male)	Mutations in <i>lacI</i> transgene in liver	The target <i>lacI</i> gene is recovered from genomic DNA after five daily doses and the animals sacrificed 7 d after the first dose	– (T)	35 mg/kg-day (5 times)	Mirsalis et al., 1994
Mouse (CD2F1 <i>lacZ</i> transgenic, male)	Mutations in the <i>lacZ</i> transgene in liver	The target <i>lacZ</i> gene is recovered from genomic DNA	– (T)	80 mg/kg by oral gavage in corn	Lambert et al., 2005; Tombolan et al., 1999

Mutamouse™, male)			after a single dose with the animals being sacrificed 14 d later		oil	
Mouse (CD2F1 <i>lacZ</i> transgenic, Mutamouse™, male)	Mutations in the transgene in liver	<i>lacZ</i>	The target <i>lacZ</i> gene is recovered from genomic DNA after dosing with the animals being sacrificed 7, 14, or 28 d later	– (T)	1,400 mg/kg by oral gavage	Lambert et al., 2005; Hachiya and Motohashi, 2000

Table 4-11E. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Rat (Wistar, male)	DNA binding in liver	DNA extracted from liver of rats (with or without methylcholanthrene pretreatment) sacrificed 12 hrs after dosing	-	56 mg/kg i.p.	Rocchi et al., 1973
Mouse (Swiss, male)	DNA binding in liver	DNA extracted from liver of mice (some pretreated with methylcholanthrene) sacrificed 12 hrs after dosing	+h	56 mg/kg i.p.	
Rat (Sprague-Dawley, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of rats sacrificed 6 hrs after dosing	±	1.4 mg/kg i.p. in olive oil	Diaz Gomez and Castro, 1980a
Mouse (A/J, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of mice sacrificed 6 hrs after dosing	±	1.4 mg/kg i.p. in olive oil	
Mouse (A/J, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of mice sacrificed 6 hrs after dosing	+ (T)	3,200 mg/kg i.p. in olive oil	
Rat (Sprague-Dawley, male)	DNA binding to mitochondria and nucleus	Mitochondrial DNA isolated from the livers at 5 and 24 hrs after dosing	+ (T)	3.2 mg/kg in corn oil	Levy and Brabec, 1984
Rat (Sprague-Dawley, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of rats sacrificed 6 hrs after dosing	±	1,200 mg/kg i.p. in olive oil	Castro et al., 1989
Mouse (C3H, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of mice sacrificed 6 hrs after dosing	±	1,200 mg/kg i.p. in olive oil	
Hamster (Syrian golden, male)	DNA binding in liver	DNA isolated from liver slices of hamsters sacrificed 6 hrs after dosing	±	1,200 mg/kg i.p. in olive oil	

Table 4-11F. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Rat (strain and sex not specified)	DNA adducts in liver	Deoxyguanosine-malondialdehyde adducts measured 48 hrs after dosing	+ (T)	1,600 mg/kg by oral gavage	Hadley and Draper, 1990
Rat (Sprague-Dawley, sex not specified)	DNA adducts in liver	M1dG adducts formed secondary to lipid peroxidation measured 4 d after dosing	+ (T)	0.1 mg/kg by oral gavage in corn oil	Chaudhary et al., 1994
Rat (strain and sex not specified)	DNA adducts in liver	Deoxyguanosine-malondialdehyde adducts measured 48 hrs after dosing	–	160 mg/kg by oral gavage	Draper et al., 1995
Hamster (Syrian golden, female)	DNA adducts in liver and kidney	13-HPO and malondialdehyde-derived adducts formed secondary to lipid peroxidation detected by [32P]-postlabelling analysis 4 hrs after treatment	± (T)	160 mg/kg by oral gavage in corn oil	Wang and Liehr, 1995
Rat (F344, male)	DNA adducts in liver	4-HNE-dG adducts formed secondary to lipid peroxidation	+ (T)	3,200 mg/kg i.p. in olive oil	Chung et al., 2000
Rat (F344, female)	DNA adducts in liver, kidney, lung, colon, and forestomach	4-HNE-dG adducts formed secondary to lipid peroxidation. Samples collected 4, 8, 16, or 24 hrs after final dose	+ (T)	500 mg/kg i.p. (1 or 4 times)	Wacker et al., 2001
Rat (Fischer, male)	DNA adducts in liver	8-OHdG adducts were measured by immunohistochemistry and electrochemical detection at times from 6 hrs to 7 d	+ (T)	3,200 mg/kg by oral gavage in olive oil	Takahashi et al., 1998
Rat (F344, male)	DNA adducts in liver	8-OHdG adducts measured at the end of wk 1 after dosage on d 1 and 4	± (T)	400 mg/kg by s.c. injection (2 times)	Iwai et al., 2002
Rat (F344, male)	DNA adducts in urine	8-OHdG adducts measured in the urine 7 and 16 hr after a single dose	+ (T)	120 mg/kg by i.p. injection	Kadiiska et al., 2005
Mouse (CD-1, female)	DNA binding in liver	8-oxodG measured in the livers of 2- and 14-mo animals dosed for 3 d and sacrificed on d 4.	+	43 mg/kg i.p. in mineral oil	Lopez-Diazguerrero et al., 2005

Mouse (ICR, male)	DNA binding in liver	[32P]-Postlabeling was used to identify indigenous adducts present 24 hrs after a single injection	+ (T)	1,200 mg/kg by i.p. in Nath et al., 1990 corn oil
Mouse (ICR, male)	DNA binding in liver	[32P]-Postlabeling was used to identify indigenous and exogenous adducts present 1, 4, and 8 wks after two injections given a wk part.	- (T)	1,200 mg/kg by i.p. in corn oil

Table 4-11G. Genotoxicity studies of carbon tetrachloride in mammalian systems *in vivo*

Test system	Endpoint	Test conditions	Results ^a	Dose ^c	Reference
Rat (F344, male)	DNA methylation in liver	Hydrolyzed DNA was analyzed for aberrant methylation as increases in 7-methylguanine and O6-methylguanine, 12 hrs after dosing	+ (T)	1,000 mg/kg in corn oil	Barrows and Shank, 1981
Rat (Wistar, male)	DNA hypo- methylation in liver	The <i>in vitro</i> incorporation of [3H]-methyl groups into isolated hepatic DNA was increased indicating that the DNA was hypomethylated.	+	800 mg/kg by i.p. injection 2 times per wk for 3 wks	Varela-Moreiras et al., 1995

a+ = positive, ± = equivocal or weakly positive, – = negative, (T) = toxicity, ND = no data.

bExogenous metabolic activation not applicable (NA) for these *in vivo* studies.

cLowest effective dose for positive results, highest dose tested for negative results, ND = no data, NA = not applicable; i.m. = intramuscular, s.c. = subcutaneous.

dThe small statistically significant increase detected was considered biologically insignificant by the authors (and other reviewers).

eAt this dose, a roughly threefold increase in micronucleus formation was seen along with a decrease in binucleated cells (about 35–50%) indicating a cytostatic and cytotoxic effect.

fTUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling.

gIncrease was in both centromere-lacking (5.5-fold) and centromere-containing (3.6-fold) micronuclei.

hWith methylcholanthrene pretreatment only.

4-HNE-dG = deoxyguanosine adducts of 4-HNE; 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine = 8-oxodG

Note: The data in the paper by Sarkar et al (1999) were judged to be insufficiently reliable to be included in the table.

Annexe 4 : Résultats Toxtree (version 2.6.13) : QSAR for *In vitro* mutagenicity

QSA1_Ames.Acyl halides No
QSA2_Ames.Alkyl (C5) or benzyl ester of sulphonic or phosphonic acid No
QSA3_Ames.N-methylol derivatives No
QSA4_Ames.Monohaloalkene No
QSA5_Ames.S or N mustard No
QSA6_Ames.Propiolactones and propiosultones No
QSA7_Ames.Epoxides and aziridines No
QSA8_Ames.Aliphatic halogens No
QSA9_Ames.Alkyl nitrite No
QSA11_Ames.Simple aldehyde No
QSA12_Ames.Quinones No
QSA13_Ames.Hydrazine No
QSA14_Ames.Aliphatic azo and azoxy No
QSA15_Ames.Isocyanate and isothiocyanate groups No
QSA16_Ames.Alkyl carbamate and thiocarbamate No
QSA18_Ames.Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA19_Ames.Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA21_Ames.Alkyl and aryl N-nitroso groups No
QSA22_Ames.Azide and triazene groups No
QSA23_Ames.Aliphatic N-nitro No
QSA24_Ames.α,β unsaturated alkoxy No
QSA25_Ames.Aromatic nitroso group No
QSA26_Ames.Aromatic ring N-oxide No
QSA27_Ames.Nitro aromatic No
QSA28_Ames.Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions) No
QSA28bis_Ames.Aromatic mono- and dialkylamine No
QSA28ter_Ames.Aromatic N-acyl amine No
QSA29_Ames.Aromatic diazo No
QSA30_Ames.Coumarins and Furocoumarins No
QSA37_Ames.Pyrrolizidine Alkaloids No
QSA38_Ames.Alkenylbenzenes No
QSA39_Ames.Steroidal estrogens No
QQSAR13 applicable?.α,β unsaturated aldehyde No
QSA10_Ames.α,β unsaturated carbonyls No
QaN=Na.Aromatic diazo No
Qar-N=CH2.Derived aromatic amines No
QQSAR6 applicable?.Aromatic amine without sulfonic group on the same ring No
QSA57_Ames.DNA Intercalating Agents with a basic side chain No
QSA58_Ames.Haloalkene cysteine S-conjugates No
QSA59_Ames.Xanthenes, Thioxanthenes, Acridones No
QSA60_Ames.Flavonoids No
QSA61_Ames.Alkyl hydroperoxides No
QSA62_Ames.N-acyloxy-N -alkoxybenzamides No
QSA63_Ames.N-aryl-N-acetoxyacetamides No
QSA64_Ames.Hydroxamic acid derivatives No
QSA65_Ames.Halofuranones No
QSA66_Ames.Anthrone No

QSA67_Ames.Triphenylimidazole and related No
QSA68_Ames.9,10 - dihydrophenanthrenes No
QSA69_Ames.Fluorinated quinolines No

Annexe 4 (suite 1) : Résultats Toxtree (version 2.6.13) : QSAR for *in vivo* micronucleus

QSA1.Acyl halides No
QSA2.Alkyl (C5) or benzyl ester of sulphonic or phosphonic acid No
QSA3.N-methylol derivatives
QSA4.Monohaloalkene No
QSA5.S or N mustard No
QSA6.Propiolactones and propiosultones No
QSA7.Epoxides and aziridines No
QSA8.Aliphatic halogens No
QSA9.Alkyl nitrite No
QSA10.α,β unsaturated carbonyls No
QSA11.Simple aldehyde No
QSA12.Quinones No
QSA13.Hydrazine No
QSA14.Aliphatic azo and azoxy No
QSA15.Isocyanate and isothiocyanate groups No
QSA16.Alkyl carbamate and thiocarbamate No
QSA18.Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA19.Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA21.Alkyl and aryl N-nitroso groups No
QSA22.Azide and triazene groups No
QSA23.Aliphatic N-nitro No
QSA24.α,β unsaturated alkoxy No
QSA25.Aromatic nitroso group No
QSA26.Aromatic ring N-oxide No
QSA27.Nitro aromatic No
QSA28.Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions) No
QSA28bis.Aromatic mono- and dialkylamine No
QSA28ter.Aromatic N-acyl amine No
QSA29.Aromatic diazo No
QSA30.Coumarins and Furocoumarins No
QSA32.1,3-dialkoxy-benzene No
QSA33.1-phenoxy-benzene No
QSA34.H-acceptor-path3-H-acceptor No
QSA35.Oxolane No
QSA36.Carbodiimides No
QAny alert?.At least one alert fired? No Class No alerts for the micronucleus assay (Class II)

Annexe 4 (suite 2) : Résultats Toxtree (version 2.6.13) : QSAR for carcinogenicity (genotox and non-genotox)

QSA1_gen.Acyl halides No
QSA2_gen.Alkyl (C5) or benzyl ester of sulphonic or phosphonic acid No
QSA3_gen.N-methylol derivatives No
QSA4_gen.Monohaloalkene No
QSA5_gen.S or N mustard No
QSA6_gen.Propiolactones and propiosultones No
QSA7_gen.Epoxides and aziridines No
QSA8_gen.Aliphatic halogens No
QSA9_gen.Alkyl nitrite No
QSA11_gen.Simple aldehyde No
QSA12_gen.Quinones No
QSA13_gen.Hydrazine No
QSA14_gen.Aliphatic azo and azoxy No
QSA15_gen.Isocyanate and isothiocyanate groups No
QSA16_gen.Alkyl carbamate and thiocarbamate No
QSA18_gen.Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA19_gen.Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons No
QSA21_gen.Alkyl and aryl N-nitroso groups No
QSA22_gen.Azide and triazene groups No
QSA23_gen.Aliphatic N-nitro No
QSA24_gen.α,β unsaturated alkoxy No
QSA25_gen.Aromatic nitroso group No
QSA26_gen.Aromatic ring N-oxide No
QSA27_gen.Nitro aromatic No
QSA28_gen.Primary aromatic amine, hydroxyl amine and its derived esters (with restrictions) No
QSA28bis_gen.Aromatic mono- and dialkylamine No
QSA28ter_gen.Aromatic N-acyl amine No
QSA29_gen.Aromatic diazo No
QSA30_gen.Coumarins and Furocoumarins No
QSA37_gen.Pyrrolizidine Alkaloids No
QSA38_gen.Alkenylbenzenes No
QSA39_gen_and_nogen.Steroid estrogens No
QGenotoxic alert?.At least one alert for genotoxic carcinogenicity fired? No Class Negative for genotoxic carcinogenicity
QQSAR13 applicable?.α,β unsaturated aldehyde No
QSA10_gen.α,β unsaturated carbonyls No
QaN=Na.Aromatic diazo No
Qar-N=CH2.Derived aromatic amines No
QQSAR6,8 applicable?.Aromatic amine without sulfonic group on the same ring No
QSA17_nogen.Thiocarbonyl (Nongenotoxic carcinogens) No
QSA20_nogen.(Poly) Halogenated Cycloalkanes (Nongenotoxic carcinogens) No
QSA31a_nogen.Halogenated benzene (Nongenotoxic carcinogens) No

QSA31b_nogen.Halogenated PAH (naphthalenes, biphenyls, diphenyls) (Nongenotoxic carcinogens) No

QSA31c_nogen.Halogenated dibenzodioxins (Nongenotoxic carcinogens) No

QSA39_gen_and_nogen.Steroidal estrogens No

QSA40_nogen.substituted phenoxyacid No

QSA41_nogen.substituted n-alkylcarboxylic acids No

QSA42_nogen.phthalate diesters and monoesters No

QSA43_nogen.Perfluorooctanoic acid (PFOA) No

QSA44_nogen.Trichloro (or fluoro) ethylene and Tetrachloro (or fluoro) ethylene No

QSA45_nogen.indole-3-carbinol No

QSA46_nogen.pentachlorophenol No

QSA47_nogen.o-phenylphenol No

QSA48_nogen.quercetin-type flavonoids No

QSA49_nogen.imidazole and benzimidazole No

QSA50_nogen.dicarboximide No

QSA51_nogen.dimethylpyridine No

QSA52_nogen.Metals, oxidative stress No

QSA53_nogen.Benzensulfonic ethers No

QSA54_nogen.1,3-Benzodioxoles No

QSA55_nogen.Phenoxy herbicides No

QSA56_nogen.alkyl halides **Yes** C(Cl)(Cl)(Cl)Cl

QNongenotoxic alert?.At least one alert for nongenotoxic carcinogenicity fired? **Yes Class Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity** C(Cl)(Cl)(Cl)Cl

Notes





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)