

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 1^{er} juin 2022

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

**relatif à l'évaluation des risques liés à la présence de 2-chloroéthanol (2-CE)
dans du gluten incorporé dans des denrées alimentaires**

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 23 mars 2022 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à l'évaluation des risques liés à la présence de 2-chloroéthanol (2-CE) dans du gluten destiné à être incorporé dans des denrées alimentaires.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Une alerte sanitaire concernant la détection de 2-chloroéthanol (2-CE) dans des mix à base de gluten vital¹ a été rapportée le 23 mars 2022 par la DGCCRF. La présence de 2-CE a été détectée par les préparateurs des mix de gluten qui sont destinés à être incorporés dans des farines utilisées pour la fabrication de différents produits finis, dont de panification comme le pain, les viennoiseries, etc. A la suite de cette détection, le fabricant du gluten mis en cause a réalisé des analyses sur son échantillothèque et a confirmé que le gluten était l'ingrédient alimentaire contaminé. Le fabricant a également analysé un ensemble conséquent de

¹ Le gluten vital est la forme de gluten destiné à l'alimentation humaine

plusieurs centaines de lots récents de gluten, amidon et autres coproduits. L'oxyde d'éthylène (ETO) auquel le métabolite 2-CE est communément associé n'a été détecté dans aucun échantillon.

Selon la DGCCRF, ces résultats excluent tout lien avec une contamination ou un traitement par l'ETO, traitement interdit en Europe, et seraient ainsi concordants avec l'origine française des blés.

Dans ce contexte, il est demandé à l'Anses de mener une expertise en urgence afin de répondre aux questions suivantes :

- Quel est le niveau d'exposition alimentaire et le niveau de préoccupation sanitaire associé ?
- Pouvez-vous, sur la base des éléments disponibles, conclure sur le niveau de préoccupation sanitaire pour les produits finis au sein desquels le 2-CE n'est pas quantifiable (< 0,02 mg/kg) ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été conduite dans le respect de la norme NF X50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

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 publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'expertise a été confiée au Groupe d'évaluation collective d'urgence (GECU), intitulé « 2-Chloroéthanol », qui s'est réuni à plusieurs reprises entre le 6 avril et le 16 mai 2022. Le présent document a été validé par le GECU 2-CE, le 16 mai 2022. Ce GECU 2-CE a été constitué de 6 experts membres de collectifs de l'Anses, appuyés par des agents spécialistes dans les calculs d'exposition de l'Unité Méthodologie et Etudes, au sein de la Direction de l'Evaluation des Risques de l'Anses (Annexe 1).

Plusieurs échanges d'informations ont eu lieu entre l'Anses et la DGCCRF à partir du 23 mars 2022 pour compléter les premières informations reçues sur cette alerte. Les premières données mises à disposition par le producteur de gluten ont été reçues le 23 mars 2022. Des données complémentaires sollicitées par l'Anses à partir du 30 mars 2022 ont été reçues le 5 avril, le 21 avril et le 22 avril 2022.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU 2-CE

3.1. Caractérisation physico-chimique du 2-CE

Le 2-CE est référencé sous les numéros CAS 107-07-3 et EC 203-459-7. De formule brute C_2H_5ClO et de masse molaire 80,5 g/mol, il se présente sous forme de liquide incolore à température ambiante, à l'odeur proche de celle de l'éther. Il est modérément inflammable et

totallement miscible à l'eau. Son logP est de 0,03. Il ne se dissocie² pas dans l'eau, quel que soit le pH (pKa = 14,86). Sa température de fusion est de -70 °C et celle d'ébullition de 129 °C. Sa pression de vapeur est de 7 mbar à 20 °C, ce qui en fait un composé relativement peu volatile à cette température.

Selon un document du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les résidus de pesticides, le 2-CE peut réagir avec les acides gras pour former des esters (EURL-SRM, 2020). Selon ce même document, le traitement thermique de pratiques culinaires dégrade significativement le 2-CE en acétaldéhyde³.

Le 2-CE est généralement associé à l'oxyde d'éthylène (ETO), un biocide, dont il est un produit de dégradation. Dans l'eau neutre à 25 °C, l'ETO est transformé par hydrolyse et ouverture du cycle en éthylène glycol selon une demi-vie de 14 jours (309 jours à 0 °C). En présence d'ions halides, dont le chlorure, il peut former un 2-haloéthanol, dont le 2-CE, ce qui réduit le temps de demi-vie.

3.2. Réglementation européenne

Les limites maximales applicables aux résidus (LMR) d'ETO et de 2-CE présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale (Règlement CE 396/2005 consolidé au 16/12/2020⁴) sont de :

- 0,1 mg/kg pour le thé, le café, les infusions et le cacao, le houblon et les épices ;
- 0,05 mg/kg pour les noix, les graines et fruits oléagineux, et les produits apicoles ;
- 0,02 mg/kg pour les agrumes, les fruits autres, les légumes, les champignons, les céréales, les plantes sucrières et les produits d'origine animale terrestre.

Ces valeurs sont exprimées comme la somme des deux composés, en équivalent d'oxyde d'éthylène. Le détail par denrée est précisé dans le Règlement 2015/868⁵ de la Commission européenne.

L'utilisation d'ETO en tant que produit phytosanitaire n'est pas autorisée dans l'Union européenne (Règlement (CE) N° 850/2004 du 29 avril 2004⁶).

² Dissociation acido-basique

³ Cette observation fait référence à deux expérimentations impliquant le chauffage à forte température (grillées à la poêle ou cuites au four) de graines de sésame contaminées en surface par du 2-CE. Dans la présente situation d'urgence, le GECU a exclu la possible dégradation du 2-CE ainsi que la formation d'acétaldéhyde, considérant que les conditions expérimentales de ces essais sont trop éloignées des traitements thermiques des denrées incorporant à cœur du gluten vital.

⁴ Règlement (CE) N° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.

⁵ Règlement (UE) 2015/868 de la Commission du 26 mai 2015 modifiant les annexes II, III et V du règlement (CE) n° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les limites maximales applicables aux résidus de 2,4,5-T, de barbane, de binapacryl, de bromophos-éthyl, de camphechloré (toxaphène), de chlorbufame, de chloroxuron, de chlozolate, de DNOC, de diallate, de dinosébe, de dinoterbe, de dioxathion, d'oxyde d'éthylène, d'acétate de fentine, d'hydroxyde de fentine, de flucycloxuron, de flucythrinate, de formotion, de mécarbame, de méthacrifos, de monolinuron, de phénothrine, de prophame, de pyrazophos, de quinalphos, de resméthrine, de tecnazène et de vinclozoline présents dans ou sur certains produits (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

⁶ Règlement (CE) n° 850/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE

3.3. Recherche bibliographique

En raison de la situation en urgence de cette demande d'avis, le GECU 2-CE a décidé de mener une recherche bibliographique à partir de la version provisoire du rapport de l'US Environmental Protection Agency (US-EPA) intitulé « Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for 2-Chloroethanol (CASRN 107-07-3) » publié en 2012 (US-EPA, 2012). Ce rapport a été pris en compte en détail pour cette évaluation. Les bases de données PubMed (TOXNET) et Google Scholar ont été consultées afin de compléter les données du rapport de l'US-EPA. Ces bases de données ont été consultées en appliquant les Thésaurus suivants et en définissant une période entre 2011 et 2022 : PubMed = (2-chloroethanol OR 107-07-3) AND (genotoxicity OR toxicity), Google Scholar = 2 chloroethanol CAS 107-07-3 genotoxicity toxicity. Ces recherches ont donné les résultats suivants : PubMed 22 références et Google Scholar 21 références. Un tri des publications a été effectué dans le but d'identifier les études toxicologiques d'intérêt qui permettraient d'identifier des points de départ (PoD) toxicologiques pour le 2-CE. Seules 7 publications ont été retenues comme pertinentes par le GECU 2-CE après un tri fondé sur les résumés. Le retour aux articles originaux a été effectué pour toutes les publications clés retenues.

Concernant la documentation de la génotoxicité potentielle du 2-CE, ce travail s'est appuyé dans un premier temps sur des données de prédiction *in silico* obtenues avec 2 logiciels (Q)SAR différents, puis dans un deuxième temps sur les rapports de synthèse internationaux du NTP⁷ (1985) et de l'US-EPA (2012), et sur les avis de l'EFSA⁸ (2022) et du BfR⁹ (2021). Enfin dans un troisième temps, afin de compléter ce corpus de données, une revue critique de la littérature a été effectuée sur les bases de données bibliographiques Pubmed, ScienceDirect et Google Scholar ainsi que sur le site de l'ECHA¹⁰, en utilisant les mots clés « genotoxicity, mutation, mutagenesis, chloroethanol, ethylene chlorohydrin », afin d'identifier des nouvelles données de génotoxicité publiées sur la période 2011-2022. Le retour aux articles originaux a été effectué pour toutes les publications clés sur lesquelles le GECU 2-CE s'est appuyé.

3.4. Caractérisation du danger

3.4.1. Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

Absorption

La rapidité d'apparition de la mortalité dans les études de toxicité aiguë ainsi que les valeurs de dose létale à 50% (DL₅₀) relativement proches après exposition par voies orale, cutanée, parentérale et par inhalation, suggèrent que le 2-CE est rapidement et totalement absorbé après administration, quelle que soit la voie d'exposition, assurant une exposition systémique des animaux.

Distribution et excrétion

Grunow et Altman (1982, cité par US-EPA (2012)) ont mené une étude toxicocinétique dans laquelle des rats Wistar mâles ont reçu par gavage une dose orale de [1,2-¹⁴C]-2-CE (pureté radiochimique de 99 %) dans l'eau. L'étude a été menée en trois parties : étude d'élimination, étude de distribution et identification des métabolites urinaires. Dans l'étude d'élimination, six

⁷ National Toxicology Program

⁸ European Food safety Authority

⁹ Bundesinstitut für Risikobewertung

¹⁰ European Chemicals Agency

rats ont reçu des doses uniques d'environ 5 mg/kg de poids corporel (p.c.) et trois rats ont reçu des doses d'environ 50 mg/kg p.c. Après l'administration de la dose, les animaux ont été placés dans des cages métaboliques. Les urines et les fèces ont été collectées séparément toutes les 24 heures. L'air expiré a également été collecté. Après 4 jours, les animaux ont été euthanasiés. Le sang et les organes (tissus adipeux, glande surrénale, os, cerveau, cœur, intestin, rein, foie, poumon, muscle, peau, rate, estomac, testicules et thyroïde) ont été prélevés. Dans l'étude de distribution, des doses uniques de 5 mg/kg ont été administrées à huit rats, et ces animaux ont été sacrifiés après 0,5, 1, 2, 4, 6 ou 8 heures. La radioactivité a été déterminée dans le sang, le foie et les reins. Pour l'isolement et l'identification des métabolites urinaires, du 2-CE non marqué a été administré à des doses de 50 mg/kg p.c. Les résultats de l'étude d'élimination montrent qu'aux deux doses, la radioactivité a été rapidement éliminée, principalement dans l'urine. Le premier jour après l'application de 5 mg/kg, 77,2 % de la dose a été retrouvée dans l'urine, 1,7 % dans les fèces et 1,0 % sous forme de dioxyde de carbone dans l'air expiré. La radioactivité résiduelle restant dans les tissus après 4 jours était répartie de façon presque égale et s'élevait à environ 0,4 % de la dose dans le foie et à 3 % dans l'organisme entier. Pour la dose de 50 mg/kg p.c., les taux d'excrétion et les concentrations dans les tissus étaient similaires. L'examen de l'urine a révélé la présence de deux métabolites qui ont été identifiés par analyse GC/MS comme étant l'acide thiodiacétique et l'acide thionylodiacétique. Ces métabolites représentaient la quasi-totalité de la radioactivité urinaire. Ils ont été excrétés en quantités approximativement égales à la faible dose, alors que l'acide thiodiacétique prédominait avec environ 70 % de la radioactivité urinaire à la dose élevée. L'acide thiodiacétique peut être formé à partir du conjugué glutathion réduit (GSH) du chloroacétaldéhyde ou de l'acide chloroacétique par hydrolyse, puis par désamination et décarboxylation du produit intermédiaire S-carboxyméthylcystéine. L'acide thionylodiacétique est formé par oxydation de l'acide thiodiacétique.

Métabolisme

Grunow et Altmann (1982) ont résumé la voie métabolique du 2-CE comme représentée sur la Figure 1 suivante :

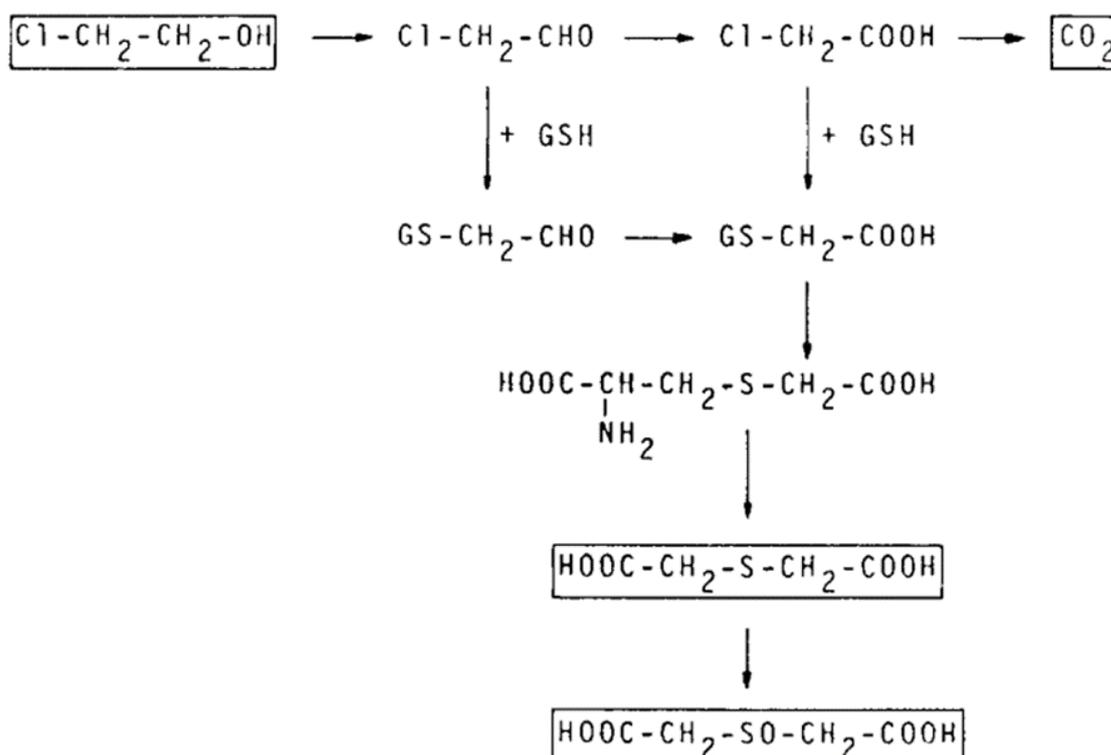


Figure 1. Voies métaboliques du 2-CE (d'après Grunow et Altmann, 1982)

Johnson (1967) a suggéré que la toxicité du 2-CE était due à la formation de chloroacétaldéhyde par l'animal en quantités supérieures à celles qui pourraient être détoxifiées par le GSH. Le 2-CE est connu pour être un substrat de l'alcool déshydrogénase cytoplasmique purifiée du foie humain, du foie de rat ou de la levure. La co-administration avec de l'éthanol réduit la toxicité du 2-CE, vraisemblablement par compétition pour l'alcool déshydrogénase. Johnson (1967, cité par NTP, 1985) a démontré la formation *in vivo* et *in vitro* de S-carboxyméthyl-GSH dans le foie de rats traités par le 2-CE. Le S-carboxyméthyl-GSH est vraisemblablement formé à partir de GSH et de chloroacétaldéhyde, le produit de déshydrogénation du 2-CE. Le S-formylméthyl-GSH est l'intermédiaire présumé. L'acide thiodiacétique et l'acide thionylodiacétique sont les métabolites retrouvés dans les urines.

Chen *et al.* (2010, cité par US-EPA (2012)) ont réalisé une étude du métabolisme chez des rats mâles Sprague-Dawley (taille du groupe non indiquée) traités une fois par voie intrapéritonéale avec une solution saline (témoins) ou 120 mg/kg p.c. de 2-CE. Trente minutes avant l'administration du 2-CE, les animaux ont été traités avec une solution saline, 5 mg/kg p.c. de fomépizole (un inhibiteur de l'alcool déshydrogénase à très haute affinité) ou 75 mg/kg p.c. de disulfirame (un inhibiteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase). Un autre groupe a été traité avec 400 mg/kg p.c./jour de N-acétylcystéine (utilisée pour augmenter les réserves de glutathion) pendant 4 jours, suivi d'une dose de 5 mg/kg p.c./jour de fomépizole et de 120 mg/kg p.c./jour de 2-CE. Les animaux ont été sacrifiés 1 heure après le traitement au 2-CE, et le sang, les reins et le foie ont été collectés. Le chloroacétaldéhyde a été mesuré dans le plasma et le glutathion a été mesuré dans le foie et les reins. Les auteurs de l'étude ont également déterminé des valeurs de DL₅₀ pour le 2-CE. L'addition de fomépizole a réduit la conversion du 2-CE en chloroacétaldéhyde et la toxicité résultante du 2-CE a été réduite. Le traitement par le disulfirame a augmenté la concentration de chloroacétaldéhyde avec une augmentation

de la toxicité du 2-CE. Les concentrations de glutathion étaient significativement inférieures à celles du groupe témoin dans le foie après traitement avec le 2-CE. Cette étude corrobore la voie métabolique proposée telle qu'elle est décrite ci-dessus.

Hung *et al.* (2006, cité par US-EPA (2012)) ont évalué le 4-méthylpyrazole (4-MP) comme antidote à la toxicité du 2-CE par prétraitement de rats (nombre et souche non spécifiés) avec du 4-MP ou un contrôle salin suivi d'une injection intra-péritonéale avec plusieurs doses (non spécifiées) de 2-CE. Le 4-MP est un puissant inhibiteur de l'alcool déshydrogénase qui catalyse la conversion du 2-CE en chloroacétaldéhyde. La concentration sanguine de chloroacétaldéhyde dans le groupe traité était de 42,7 % inférieure à celle des témoins non traités. Le traitement par le 4-MP a également élevé le niveau de la DL₅₀ de 58 mg/kg p.c. (valeur témoin) à 180 mg/kg p.c. Cette étude est disponible uniquement sous forme de résumé avec peu de détails.

En résumé, l'ensemble de ces études suggère que le 2-CE est métabolisé en chloroacétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase cytoplasmique, puis en acide 2-chloroacétique par l'aldéhyde déshydrogénase. Le chloroacétaldéhyde et l'acide 2-chloroacétique peuvent ensuite être conjugués au glutathion (GSH). L'excrétion urinaire, principalement sous forme d'acide thiodiacétique et d'acide thionylodiacétique, est rapide.

3.4.2. Données toxicologiques

3.4.2.1. Toxicité aiguë

Par voie orale

Sur le site de l'ECHA l'étude clé de toxicité aiguë par voie orale chez le rat a révélé une valeur de DL₅₀ de 77 mg/kg p.c. Dans cette étude, des groupes de 5 rats mâles et 5 rats femelles ont reçu par gavage des doses de 60, 77, 96, 120 et 240 mg/kg p.c. La période d'observation post-exposition a été de 14 jours. Les signes cliniques sont apparus immédiatement après le gavage : les rats sont restés calmes et ont montré des mouvements retardés, après environ 1 heure en position couchée ou sur le côté, apathie, réduction du tonus musculaire, respiration anormale, yeux rougis et, le jour suivant, mucus sanglant ; aucun signe clinique n'a été observé après le 8^{ème} jour. Aux niveaux des doses élevées, les rats sont morts principalement dans les 4 heures et des décès ultérieurs ont également été observés. En général, les femelles sont mortes plus tôt que les mâles. L'autopsie a révélé un cœur dilaté, une musculature maigre, un foie et des reins jaunâtres, un ulcère hémorragique de l'estomac, un contenu intestinal mou et rougi ; aucun effet n'a été détecté chez les rats survivants.

Cinq autres études de toxicité aiguë par voie orale chez le rat vont dans le même sens avec des valeurs de DL₅₀ comprises entre 60 et 90 mg/kg p.c. (Van-den-Heuvel *et al.*, 1990 ; Lawrence *et al.*, 1971 ; Goldblatt *et al.*, 1944 ; Sauvant *et al.*, 1995).

Deux études de toxicité aiguë par voie orale chez la souris (Weisbrod *et al.*, 1980) ; Lawrence *et al.*, 1971) ont révélé une valeur de DL₅₀ de 81 et 150 mg/kg p.c., respectivement.

Par inhalation

Dans une étude de toxicité aiguë par inhalation (Carpenter, 1949, cité par l'ECHA), six rats Sherman par niveau de dose ont été exposés pendant 4 heures à des concentrations de 2-CE variant selon une progression géométrique augmentant d'un facteur 2. La période d'observation après exposition était de 14 jours. À une concentration de 32 ppm (107 mg/m³), 2 à 4 des 6 rats traités sont morts. Aucun autre détail n'a été rapporté dans la section des résultats. Cependant, on peut supposer qu'une concentration de 16 ppm n'a entraîné aucune mortalité ou seulement 1 mort sur 6 rats traités et qu'à une concentration de 62 ppm, plus de 4 rats traités sur 6 sont morts. En conclusion, l'estimation approximative de la concentration létale à 50% (CL₅₀ 4 h) chez le rat est comprise entre 16 ppm (53 mg/m³) et 62 ppm (207 mg/m³).

L'ECHA rapporte également une étude de toxicité aiguë par inhalation dans laquelle des rats exposés à de la vapeur saturée (concentration calculée de 2-CE : 8 à 20 mg/L) sont morts après une période d'exposition ≥ 10 minutes (BASF AG, 1973).

Goldblatt *et al.* (1944, cité par l'ECHA) ont détecté des effets létaux à des concentrations de 2000 mg/m³ de 2-CE après une durée d'exposition de 120 minutes chez le rat.

Ambrose (1950) a indiqué des effets létaux à 13,4 mg/m³ (4 ppm) chez le rat après deux expositions d'une heure chacune, avec un intervalle de 2 heures. Une concentration de 6,7 mg/m³ (2 ppm) n'a pas causé la mort après une seule exposition mais a produit une paralysie chez certains rats, et finalement la mort, après des expositions répétées.

Dans une autre étude sur des souris, la valeur de la CL₅₀ était de 117 ppm (NTP, 1985).

Par voie cutanée

Dans une étude de toxicité aiguë par voie cutanée (Lawrence *et al.*, 1971, cité par l'ECHA), des groupes de 4 à 5 lapins (mâles et femelles) ont été exposés à des doses graduelles de 2-CE pendant 24 heures. La période d'observation après exposition était de 7 jours. Les auteurs ont calculé une DL₅₀ de 68 mg/kg p.c.

Une étude de toxicité aiguë par voie cutanée menée par BASF AG (1973) a décrit une valeur de DL₅₀ de 240 mg/kg p.c. chez le lapin.

Ambrose (1950) a montré que des lapins, exposés à 600 mg de 2-CE (correspondant à environ 300 mg/kg p.c.) par application cutanée unique, ont survécu pendant 24 heures.

Dans une étude de toxicité aiguë par voie cutanée (NTP, 1985), des groupes de 5 souris Swiss-Webster mâles et 5 souris femelles ont été exposés. Six niveaux de dose différents ont été testés. Les souris sont mortes dans les 1 à 4 jours suivant l'application. La valeur de la DL₅₀ chez les souris mâles était de 1300 mg/kg p.c. et chez les femelles de 1940 mg/kg p.c.

Une étude de toxicité aiguë par voie cutanée a été menée par le NTP (1985) sur des rats. Des groupes de 2 à 8 mâles et 2 à 9 femelles ont été exposés au 2-CE. Le niveau de dose variait entre 38 et 2957 mg/kg p.c. chez les mâles et entre 55 et 3713 mg/kg p.c. chez les femelles.

Les rats sont morts dans les 4 heures suivant l'application. Les survivants ont été observés pendant 14 jours. La pente de la courbe dose-réponse chez les mâles n'a pas permis de calculer la valeur de la DL₅₀. Ainsi, la valeur de la DL₅₀ chez les rats mâles était comprise entre 330 et 470 mg/kg p.c. et chez les femelles la valeur de la DL₅₀ était de 416 mg/kg p.c.

Ambrose (1950) a mené une étude dans laquelle 150 mg de 2-CE/animal (correspondant approximativement à 375 mg/kg p.c.) ont été létaux chez le rat après une application cutanée.

Enfin, dans une étude de Wahlberg *et al.* (1978, cité par l'ECHA), 5 à 20 cobayes par niveau de dose ont reçu une application cutanée de 80 à 6450 mg/kg p.c. Le 2-CE non dilué (niveaux de dose élevés) ou des dilutions dans l'eau ont été appliquées. La période d'observation post-exposition était de 14 jours. A 320 mg/kg p.c., 20 animaux sur 20 sont morts le premier jour après l'application. L'estimation graphique a donné une DL₅₀ de 260 mg/kg p.c.

En conclusion de ces études de toxicité aiguë, l'ECHA retient les valeurs de DL₅₀ suivantes pour le 2-CE suivant la voie d'administration : la DL₅₀ orale aiguë dérivée de l'étude sur les rats est de 77 mg/kg pc. La CL₅₀ aiguë par inhalation (4 heures) chez le rat se situe entre 16 ppm (53 mg/m³) et 62 ppm (207 mg/m³). La DL₅₀ aiguë par voie cutanée, dérivée de l'étude clé sur les lapins (Lawrence *et al.*, 1971), est de 68 mg/kg p.c.

3.4.2.2. Toxicité subchronique

Chez le rat

Oser *et al.* (1975) ont administré du 2-CE (pureté non indiquée) dans l'alimentation de 25 rats FDRL/sexe/groupe de dose à des concentrations destinées à fournir 0, 30, 45 ou 67,5 mg/kg p.c./jour par jour pendant 6 semaines. Après 6 semaines, la méthode d'administration a été changée et est passée à un gavage en raison du manque de stabilité du composé dans l'alimentation. À ce stade, les gains de poids corporel étaient similaires dans tous les groupes et chez les deux sexes, et aucune différence n'a été notée dans les signes cliniques. Par la suite, les rats ont été mis à jeun pendant la nuit, ont eu droit à une période d'alimentation d'une heure et ont reçu par gavage quotidien pendant 12 semaines supplémentaires (volume de la dose de 10 mL/kg) des solutions aqueuses fraîchement préparées à 0, 30, 45 ou 67,5 mg/kg p.c./jour. L'eau était fournie *ad libitum*. Les rats ont été logés individuellement dans des cages à fond surélevé (aucune autre information sur l'élevage n'a été fournie). Aux semaines 6 et 12 après le début du traitement par gavage, l'urine de 10 rats/sexe/groupe de dose a été prélevée pour une analyse et le sang de ces rats a été analysé pour déterminer le taux d'hémoglobine, l'hématocrite, la numération leucocytaire totale et différentielle, le temps de prothrombine, l'urée, la glycémie, la transaminase glutamique-oxaloacétique sérique et la phosphatase alcaline sérique. Les rats ont été sacrifiés et autopsiés après 12 semaines de traitement par gavage. Le foie, les reins, le cœur, les gonades, les surrénales, la thyroïde et l'hypophyse ont été pesés. Des échantillons de tissus ont été prélevés sur 26 organes (dont le foie, les reins, les poumons, le cœur et d'autres organes non précisés dans le rapport) de 10 rats/sexe/dose dans le groupe témoins et le groupe exposé à 67,5 mg/kg p.c./jour et ont été évalués histologiquement. De plus, des échantillons de tissus du foie et des reins ont été évalués pour tous les groupes de dose.

Au cours des trois premières semaines suivant le début de l'administration par gavage, la consommation de nourriture a diminué et une respiration difficile a été observée chez la majorité des rats recevant la dose de 67,5 mg/kg p.c./jour. Ces animaux sont devenus moribonds et ont été sacrifiés ; seulement 8 des 25 mâles et 6 des 25 femelles ont survécu jusqu'à la fin de la période d'administration de 12 semaines. Dans l'ensemble (semaines 1 à 12 de l'administration par gavage), le gain de poids corporel a diminué de 34 % chez les mâles survivants à la dose de 67,5 mg/kg p.c./jour. Aucun autre effet indésirable n'a été signalé pour aucun des paramètres examinés, sauf chez les sujets décédés. Les résultats pathologiques suivants ont été observés chez les rats morts : foie foncé avec alternance de zones pâles et granuleuses, tissus gastro-intestinaux rougis et/ou sanguinolents, glandes surrénales et hypophysaires hémorragiques et poumons rouges ou rouge foncé. Les résultats histologiques qualitatifs suivants ont été notés chez les animaux morts : myocardite subaiguë (fréquemment, pour les deux sexes), déplétion colloïdale de la thyroïde (un mâle, quatre femelles), modifications graisseuses du foie (un mâle, cinq femelles), congestion de la thyroïde (quatre mâles) et modifications pulmonaires congestives (fréquemment, pour les deux sexes). Sur la base de l'absence d'effets toxicologiques observés aux doses inférieures, les auteurs de l'étude ont défini la dose de 45 mg/kg p.c./jour comme la NOAEL¹¹. Des effets francs (animaux moribonds) ont été observés chez les rats traités à la plus forte dose testée dans cette étude (67,5 mg/kg p.c./jour), qui constitue la LOAEL¹².

L'US-EPA (2012) observe que cette étude a été menée avant l'adoption des normes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Aucune analyse statistique n'a été effectuée. Il n'a pas été indiqué si la stabilité du composé dans les solutions aqueuses a été vérifiée, bien que les solutions aient été préparées fraîchement avant le dosage. Cependant, une étude du National Toxicology Program (NTP, 1985) a démontré la stabilité du composé dans de l'éthanol aqueux à 70 % pendant 21 jours à la température ambiante. Ainsi, l'ensemble de ces informations suggère que le 2-CE peut être stable dans l'eau à température ambiante. Étant donné que la dose réelle reçue au cours des 6 premières semaines (formulations alimentaires) est inconnue en raison de l'instabilité du composé testé, l'exposition totale de ces animaux est également inconnue. Néanmoins, malgré cette incertitude pendant les premières semaines d'exposition, cette étude a été utilisée par l'US-EPA pour établir une p-RfD (« provisional reference dose ») sub-chronique arrondie de 200 µg/kg p.c./jour, en appliquant un facteur cumulé de sécurité de 300 ($45 \text{ mg/kg p.c./jour} \div 300 = 150 \text{ µg/kg p.c./jour}$). La même étude a aussi permis à l'US-EPA d'établir une p-RfD chronique arrondie de 20 µg/kg p.c./jour, en appliquant un facteur cumulé de sécurité de 3000 ($45 \div 3000 = 15 \text{ µg/kg p.c./jour}$).

Ambrose (1950) a administré du 2-CE dans l'alimentation à des concentrations de 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 ou 0,24 % (équivalant à 0, 9, 18, 36, 72, 108, 144 ou 216 mg/kg p.c./jour, respectivement, selon les calculs de l'US-EPA [1988]) à cinq rats mâles par groupe de dose (souche non précisée) pendant environ 220 jours. Le gain de poids corporel a diminué aux doses de 108 mg/kg p.c./jour et plus, et la consommation de nourriture a diminué aux doses de 144 mg/kg p.c./jour et plus. L'autopsie et l'examen histologique n'ont révélé aucun effet lié au traitement. Les auteurs de l'étude n'ont pas défini de NOAEL ou de LOAEL. Les rats ayant reçu une dose de 72 mg/kg/jour n'ont présenté aucun effet lié au traitement ; ce

¹¹ La NOAEL est la plus forte dose sans effet nocif observé chez l'espèce la plus sensible (pertinente) ou « Non Observed Adverse Effect Level »

¹² La LOAEL est la plus petite dose minimale avec un effet nocif observé chez l'espèce la plus sensible (pertinente) ou « Lowest Observed Adverse Effect Level »

niveau de dose est donc considéré comme la NOAEL. La LOAEL est de 108 mg/kg p.c./jour, basée sur une diminution du gain de poids corporel. Étant donné que la stabilité du composé d'essai dans l'alimentation n'a pas été précisée dans cette étude et que le 2-CE s'est révélé instable dans l'alimentation (Oser *et al.*, 1975), cette étude a été considérée comme inacceptable par l'US-EPA pour le calcul d'une VTR. Le GECU 2-CE a estimé en revanche que, malgré ses limitations et son ancienneté, cette étude suggérait une absence de potentiel cancérigène associé à l'exposition par voie orale au 2-CE.

Chez le chien

Oser *et al.* (1975) ont administré du 2-CE (pureté non précisée) dans la nourriture de quatre chiens Beagle/sexe/groupe de dose pendant une période allant jusqu'à 15 semaines à des doses moyennes quotidiennes estimées à 13,3, 18,3 et 18,4 mg/kg p.c./jour chez les mâles et à 16,9, 19,3 et 20,3 mg/kg p.c./jour chez les femelles. Une dose d'environ 20 mg/kg p.c./jour semble être la dose maximale tolérée sans réponse émétique sévère. Les doses ont été administrées initialement sous forme de pâtée humide à des concentrations allant jusqu'à 1350 ppm (4445 mg/kg p.c.), mais ces concentrations ont été réduites en plusieurs étapes pour éviter la réponse émétique. Les niveaux de 2-CE ont été progressivement augmentés tant que les doses ont été acceptées par les chiens ; cependant, seule la dose la plus faible a été systématiquement retenue. Les auteurs de l'étude n'ont pas défini de NOAEL ou de LOAEL ; cependant, la dose la plus élevée qui a été systématiquement retenue par les chiens (13,3 et 16,9 mg/kg p.c./jour chez les mâles et chez les femelles) n'a montré aucun effet toxique ; par conséquent, les doses de 13,3 et 16,9 mg/kg p.c./jour sont considérées comme une NOAEL chez les mâles et les femelles, respectivement, et aucune LOAEL n'a pu être identifiée. L'US-EPA (2012) a considéré que l'élevage et la conception/méthodologie de l'étude étaient les mêmes que ceux décrits précédemment par Oser *et al.* (1975) chez les rats avec des incertitudes par conséquent similaires (stabilité du composé dans le régime alimentaire non-rapportée). Par ailleurs, il n'était pas clair la façon dont la dose moyenne quotidienne estimée pouvait être déterminée avec précision en raison de la réaction émétique signalée. Les groupes traités à dose moyenne et à dose élevée ont reçu approximativement la même dose.

Chez le singe

Oser *et al.* (1975) ont administré par voie orale, à l'aide d'une seringue, du 2-CE (pureté non précisée) dans un véhicule de compote de pommes à deux singes rhésus (*Macaca mulatta*) par sexe et par groupe de dose, pendant une période allant jusqu'à 12 semaines, à des doses quotidiennes de 0, 30, 45 ou 62,5 mg/kg p.c./jour. Les formulations des doses étaient fraîchement préparées. La conception/méthodologie de l'étude était la même que celle décrite précédemment par Oser *et al.* (1975). Aucun effet indésirable n'a été signalé pour aucun groupe de dose. Les auteurs de l'étude n'ont pas défini de NOAEL ou de LOAEL ; cependant, la dose la plus élevée (62,5 mg/kg p.c./jour) n'a montré aucun effet. Ainsi, 62,5 mg/kg p.c./jour est considéré comme la NOAEL et aucune LOAEL n'a pu être identifiée. L'US-EPA (2012) a considéré que l'élevage, la conception et la méthodologie de l'étude étaient les mêmes que ceux décrits précédemment par Oser *et al.* (1975) chez les rats avec des incertitudes, par conséquent, similaires (stabilité du composé dans le régime alimentaire non-rapportée). D'autre part, l'utilisation de 2 animaux par groupe de dose empêche toute analyse statistique.

D'autres études de toxicité à doses répétées chez le rat ont été rapportées sur le site de l'ECHA pour d'autres voies d'administrations au 2-CE (voie cutanée, par inhalation et voie intrapéritonéale). Cependant les données sont très anciennes et les informations sont très limitées.

3.4.2.3. Toxicité chronique et cancérogénèse par voie orale

Il n'a pas été possible d'identifier d'étude de toxicité chronique ou de cancérogénèse du 2-CE par voie orale.

En revanche, Sakai *et al.* (2002) ont réalisé une étude de cancérogénèse à court terme avec 26 produits chimiques, dont le 2-CE, en utilisant un modèle d'initiation dont le principe consiste à évaluer la présence de foyers cellulaires positifs à la GST-P (glutathion S-transférase de forme placentaire), un marqueur de lésions pré-néoplasiques hépatiques. Pour cela une dose unique de chaque produit a été administrée à des rats Fisher 344 mâles 12 heures après une hépatectomie partielle. Le 2-CE a été administré aux animaux (n=16) par voie intra-gastrique à la dose de 15 mg/kg en suspension dans une solution saline (NaCl 0,9%). Puis les rats ont été exposés au 2-acétylamino-fluorène et au tétrachlorure de carbone afin de stimuler la prolifération des cellules potentiellement initiées. Après 5 semaines, les animaux ont été sacrifiés et des analyses immuno-histochimiques des foies ont été réalisées afin de rechercher la présence de foyers positifs à la GST-P. Pour le 2-CE, les résultats n'ont pas montré d'augmentation du nombre de foyers GST-P(+) ($1,34 \pm 1,21$) par rapport au groupe témoin ($1,8 \pm 1,5$). Le 2-CE a donc été considéré dans cet essai comme n'ayant pas de potentiel d'initiation.

3.4.2.4. Toxicité chronique et cancérogénèse par voie cutanée

Des études de toxicité chronique et de cancérogénèse ont été réalisées par exposition cutanée chez le rat et chez la souris (NTP, 1985). Concernant l'étude chez le rat, du 2-CE a été appliqué sur la peau rasée de 50 rats F344N/sexe/dose à des doses de 0, 50 ou 100 mg/kg p.c./jour, 5 jours/semaine pendant une période de 103 semaines. Aucun effet indésirable n'a été signalé, et aucun signe de potentiel cancérogène n'a été détecté. Il est donc possible de considérer la plus forte dose de 100 mg/kg p.c./jour comme la NOAEL, aucune LOAEL n'a pu être identifiée.

Pour l'étude chez la souris, du 2-CE a été appliqué sur la peau rasée de 50 souris Swiss CD-1/sexe/dose à des doses de 0, 7,5 ou 15 mg/animal/jour, 5 jours/semaine pendant une période de 104 semaines. Chez les mâles, la survie à la dose de 15 mg/jour était de 12/50 contre 26/50 chez les témoins. Chez les souris mortes, ont été observées une inflammation et une ulcération locales, ainsi qu'une congestion, une inflammation ou une hémorragie pulmonaire. Une augmentation de l'incidence de tumeurs alvéolaires/bronchiolaires et des lymphomes malins ont été observés chez les souris mâles à la faible dose suggérant une réponse possible à l'application cutanée de 2-CE ; cependant, il n'y avait pas de relation dose-effet pour l'apparition de ces tumeurs et d'autre part une telle augmentation n'a pas été observée chez les souris femelles ni chez les rats mâles et femelles exposés au 2-CE. Ainsi, ces augmentations n'ont pas été considérées comme étant liées au composé et les auteurs concluent qu'aucune preuve de potentiel cancérigène n'a été trouvée. Aucun effet indésirable chez les souris femelles n'a pu être observé jusqu'à la dose de 15 mg/souris/jour. Il peut donc

être considéré une NOAEL chez les mâles de 7,5 mg/souris/jour, soit 180 mg/kg p.c./jour pendant 104 semaines 5 jours par semaine.

L'US-EPA (2012) a considéré que les résultats de ces études ont été biaisées par l'utilisation de l'éthanol comme véhicule. Bonitenko *et al.* (1981) ont démontré que l'administration simultanée d'éthanol a un effet protecteur contre la toxicité du 2-CE, quelle que soit la voie d'administration (orale ou cutanée), en augmentant la DL₅₀, en réduisant l'incidence des lésions nécrotiques hépatiques et rénales et en augmentant la concentration sanguine du 2-CE. Blair et Vallee (1966) ont démontré que le 2-CE est un substrat pour l'alcool déshydrogénase cytoplasmique purifiée du foie humain, et Sood et O'Brien (1994) ont montré que la cytotoxicité induite par le 2-chloroacétaldéhyde (2-CAA) dans des hépatocytes isolés était nettement accrue si l'alcool ou l'aldéhyde déshydrogénase des hépatocytes était inhibée avant l'administration du 2-CAA. Malgré le facteur de confusion qu'introduit le choix du véhicule, il convient de noter que les souris mâles ont été traitées jusqu'à des niveaux toxiques (comme l'indique l'augmentation de la mortalité) sans qu'il y ait de signe de potentiel cancérigène (NTP, 1985).

Plus récemment, dans un travail rétrospectif d'analyse des résultats de cancérogénicité obtenus dans des études de toxicité sur 2 ans chez des rats F334/N et de souris B6C3F1 conduites au sein du National Toxicological Program, le potentiel néoplasique du 2-CE par voie cutanée, ainsi que d'autres substances chimiques, a été analysé par rapport à : l'incidence des tumeurs par catégorie espèce-sexe, la concordance des sites tumoraux entre les espèces et la concordance des sites tumoraux entre les sexes au sein des espèces (Smith et Perfetti, 2018). De plus, lorsqu'ils étaient disponibles, les résultats d'analyse sur la mutagénicité dans des tests d'Ames, et tout autre résultat d'un test de génotoxicité autre que le test d'Ames, ont été pris en compte et corrélés avec les résultats du potentiel de néoplasie. Dans cette étude, le 2-CE a été classé parmi les substances chimiques pour lesquelles aucune preuve claire de néoplasie chez les rats mâles, les rats femelles, les souris mâles et souris femelles n'a pu être décelée.

Mason *et al.* (1971) ont évalué l'incidence des tumeurs chez des rats F344 après des injections sous-cutanées de 2-CE dans une solution saline à des doses de 0, 0,3, 1, 3 ou 10 mg/kg p.c./jour 2 fois par semaine pendant 52 semaines, suivies d'une observation sans traitement pendant 26 semaines. Il a été déclaré que des adénomes de l'hypophyse ont été observés chez 7/100 rats femelles ayant reçu du 2-CE (tous groupes de doses confondus) par rapport à 1/50 témoins. Les données n'ont pas été présentées pour permettre la vérification d'un effet dose-dépendant. Cette étude est considérée par l'US-EPA (2012) comme inappropriée pour l'établissement d'une VTR en raison de la voie d'administration et de l'administration de doses seulement deux fois par semaine.

Homburger (1968, cité par l'US-EPA (2012)) a évalué l'incidence des tumeurs chez les souris sur une période de 12 mois après l'administration d'une seule dose de 1,2 mg de 2-CE en intraveineuse. Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs n'a été observée. Cependant, une petite augmentation des adénomes alvéolaires/bronchiolaires (5/18 traités contre 2/18 témoins) a été notée lorsque la même dose a été administrée une fois par mois pendant 7 mois.

Dunkelberg (1983) a évalué l'incidence des tumeurs chez des souris femelles NMRI après une injection sous-cutanée hebdomadaire de 0,3, 1 ou 3 mg de 2-CE pendant environ 70 semaines. Aucun effet cancérigène n'a été noté. Dans une étude complémentaire, Dunkelberg (1983) a également évalué l'incidence des tumeurs chez les rats (nombre, souche et sexe non précisés dans le résumé) après l'administration par gavage d'une dose unique de 2,5 ou de 10,0 mg/kg p.c./jour. Aucun effet cancérigène n'a été observé.

3.4.3. Génotoxicité

3.4.3.1. Prédiction *in silico*

L'évaluation *in silico* de la génotoxicité/mutagenèse du 2-CE a été réalisée par le GECU avec les logiciels SARAH Nexus® version 3.2.0 et DEREK Nexus® version 6.2.0 (Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK). Les 2 logiciels sont validés selon les recommandations de l'OCDE (OCDE, 2007). L'utilisation de 2 modèles (Q)SAR complémentaires, l'un basé sur des statistiques (SARAH) et l'autre basé sur des règles d'expert (DEREK), permet d'améliorer la pertinence des prédictions. Le 2-CE a été renseigné par son code Smiles (CICCO). La molécule est dans le domaine d'applicabilité de chaque logiciel.

Les résultats obtenus avec le logiciel SARAH Nexus® indiquent que le 2-CE est prédit comme étant positif en termes de mutagenicité *in vitro* (test d'Ames) avec un niveau de confiance de prédiction de 100 % (Annexe 2).

Les résultats obtenus avec le logiciel DEREK Nexus® indiquent que la structure du 2-CE contient un halogénure (chlorure) d'alkyle pour lequel des alertes « possibles » apparaissent pour les aberrations chromosomiques *in vitro*, la mutagenèse *in vitro* et la cancérogenèse *in vivo* (Annexe 3). Le logiciel indique que les alertes d'aberrations chromosomiques *in vitro* (clastogénèse) et de mutagenicité sur bactéries sont généralement observées pour les agents alkylants. Les halogénures d'alkyle sont des espèces électrophiles capables de se lier directement à l'ADN. Par conséquent, de nombreux composés sont mutagènes dans le test d'Ames en présence et en l'absence d'activation métabolique (\pm S9 mix), notamment dans les souches de *Salmonella typhimurium* TA100 et TA1535 (Barber *et al.*, 1981 ; Eriksson *et al.*, 1991). En général, les chlorures d'alkyle sont moins mutagènes que leurs homologues bromés et iodés. De plus, les chlorures d'alkyle à courte chaîne, tels que le chlorure de méthyle (Andrews *et al.*, 1976), le chlorure d'éthyle (Zeiger *et al.*, 1992) et le chlorure de 2-propyle (Eriksson *et al.*, 1991 ; Simmon, 1979) sont connus pour être mutagènes. En revanche, compte tenu de la non-mutagenicité signalée pour le chlorure de n-butyle (Barber *et al.*, 1981 ; Zeiger *et al.*, 1987) et le chlorure de n-dodécyle (Zeiger *et al.*, 1992), les chlorures d'alkyle à chaîne plus longue peuvent donner un résultat négatif dans le test d'Ames (Barber *et al.*, 1981). L'alerte de cancérogenèse *in vivo* fait aussi référence à la structure d'agent alkylant du 2-CE.

Des alertes classées « possibles » ou « équivoques » sont également prédites pour l'hépatotoxicité *in vivo*, l'irritation/corrosion cutanée *in vivo*, la sensibilisation cutanée et la dysfonction mitochondriale.

En revanche aucune alerte n'a été trouvée pour la mutagenicité *in vivo* et les aberrations chromosomiques *in vivo*, ainsi que pour 53 autres classes de toxicité dont les plus

importantes : toxicité du développement, tératogenèse, cardiotoxicité, néphrotoxicité, neurotoxicité, phototoxicité, etc.

3.4.3.2. Études *in vitro*

3.4.3.2.1. Dommages à l'ADN

Dans la lignée cellulaire humaine HeLa, le 2-CE n'inhibe pas la synthèse d'ADN, avec ou sans activation métabolique (Painter et Howard, 1982, cité dans NTP, 1985). Cependant, il induit la réparation de l'ADN dans les fibroblastes humains *in vitro* (Stich *et al.*, 1976, cité dans NTP, 1985).

Le 2-CE a provoqué des dommages à l'ADN chez *Escherichia coli* (Rosenkranz *et al.*, 1974 ; Rosenkranz et Wlodkowski, 1974, cités dans NTP, 1985) mais pas chez *Bacillus subtilis* (Elmore *et al.*, 1976 ; Laumbach *et al.*, 1977, cités dans NTP, 1985).

Le 2-chloroacétaldéhyde (2-CAA), métabolite actif du 2-CE, induit la formation d'adduits à l'ADN (Oesch et Doerjer, 1982 ; cité dans NTP, 1985) et provoque des erreurs au cours de la synthèse *in vitro* de l'ADN (Hall *et al.*, 1981, cité dans NTP, 1985).

3.4.3.2.2. Mutations géniques

Sur bactéries

L'étude du potentiel mutagène du 2-CE a été conduite sur différentes souches bactériennes, notamment sur *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) et d'*Escherichia coli* (*E. coli*) avec et sans système d'activation métabolique exogène (test d'Ames). De nombreux essais ont été réalisés et sont résumés dans le rapport du NTP (1985) et dans celui de l'US-EPA (2012).

Sur 17 études menées entre 1974 et 1985, 14 études montrent que le 2-CE est mutagène (parfois uniquement à forte dose) sur les souches de *S. Typhimurium* TA1530, TA1535 et TA100 et induit des substitutions de paires de bases (Rosenkranz *et al.*, 1974 ; Rosenkranz et Wlodkowski, 1974 ; Huberman *et al.*, 1975 ; Malaveille *et al.*, 1975 ; McCann *et al.*, 1975 ; Rannug *et al.*, 1976 ; Lofroth, 1978 ; Nakamura *et al.*, 1979 ; Rannug et Beije, 1979 ; Bignami *et al.*, 1980 a,b ; Feiffer et Dunkelberg, 1980 ; Stolzenberg et Hine, 1980 ; NTP 1985). Un résultat positif est aussi rapporté sur *E. coli* (Norpoth *et al.*, 1980, cité dans NTP, 1985). Les résultats de ces études montrent également que l'effet mutagène du 2-CE est plus important en présence d'activation métabolique (S9 mix) ce qui indique que le 2-CE est principalement un agent pro-mutagène et que sa positivité dans le test d'Ames est liée à la formation d'un métabolite réactif intermédiaire, le 2-CAA.

Parmi les 17 études recensées par le NTP (1985), celle réalisée par le NTP lui-même (Haworth *et al.*, 1983 ; NTP 1985) apparaît plus particulièrement robuste. Le potentiel mutagène du 2-CE (pureté de 99 %) a été évalué dans 4 souches de *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 et TA1537, en présence ou non d'un système exogène d'activation métabolique (S9 de foies de rats et de hamsters induits par l'arochlor 1254), dans 2 expériences indépendantes (3 boîtes/dose) par la méthode de pré-incubation. Des témoins négatifs et positifs de référence ont été inclus dans chaque essai. Une étude préliminaire de toxicité a été effectuée. La gamme de doses testées s'étendait de 333 à 10 000 µg/boîte. Les résultats de cette étude montrent une augmentation biologiquement significative (mais aucune analyse statistique n'a été

effectuée) du nombre de révertants uniquement pour la souche TA1535 en présence de S9 (rat et hamster) aux doses de 3 333, 6 667 et 10 000 µg/boîte. Cette étude confirme bien que le mode d'action mutagène du 2-CE est lié à la formation d'un métabolite réactif qui induit des substitutions de paires de bases.

Dans l'étude réalisée par Rannug *et al.* (1976), les potentiels mutagènes du 2-CE et d'autres métabolites du chlorure de vinyle ont été évalués sur *S. Typhimurium* TA1535 sans activation métabolique. Aucun effet mutagène ni aucun effet toxique du 2-CE n'a été observé à faibles doses (0,1 ; 0,5 et 1,5 mM) alors qu'à la concentration plus élevée de 1 000 mM, le 2-CE s'est avéré être faiblement toxique et faiblement mutagène. En revanche pour le 2-CAA, un effet mutagène a été observé dès les faibles doses.

Bignami *et al.* (1980 a,b) ont également montré que le potentiel mutagène du 2-CE observé sur *S. Typhimurium* TA100 et TA1535 sans S9 et principalement à fortes doses était beaucoup plus important avec S9. En effet, les résultats montrent que son métabolite, le 2-chloroacétaldéhyde, est positif sur TA100 principalement en absence d'activation métabolique (l'activité mutagène du 2-CAA est en partie réduite en présence de S9 en raison de sa conversion par une oxido-réductase hépatique en acide chloroacétique non mutagène).

De façon comparable, McCann *et al.* (1975) ont évalué le potentiel mutagène du 2-CE et du 2-CAA sur *S. Typhimurium* TA100 et TA1535. Le 2-CE s'est avéré être négatif en absence d'activation métabolique (S9 de foies de rats induits à l'arochlor) dans les 2 souches testées. En revanche, en présence de S9 des effets mutagènes faibles dans la souche TA1535 et forts dans la souche TA100 ont été observés. Le 2-CAA quant à lui s'est avéré positif uniquement dans la souche TA100 sans activation métabolique (le 2-CAA n'a pas été testé avec S9). Les auteurs suggèrent que le 2-CAA pourrait être le métabolite actif du 2-CE, ce qui soutient l'hypothèse préalablement énoncée par Johnson (1967) selon laquelle le 2-CAA pourrait être à l'origine de la mutagénicité *in vitro* attribuée au 2-CE.

L'ajout de S9 réduit la mutagénicité du 2-CAA probablement par oxydation en acide chloroacétique qui n'est pas mutagène chez *S. Typhimurium* (McCann *et al.*, 1975 ; Huberman *et al.*, 1980 ; Bignami *et al.*, 1980b, cités dans NTP, 1985), *E. coli* (Mamber *et al.*, 1983) ou sur cellules de mammifères V79 au locus HGPRT (Huberman *et al.*, 1975). Amacher et Turner (1982, cité dans NTP, 1985) ont toutefois signalé que l'acide chloroacétique pourrait être faiblement mutagène dans l'essai du lymphome de souris en présence de S9.

Enfin, un test de mutations géniques sur bactéries est aussi disponible sur le site de l'ECHA dans le dossier d'enregistrement REACH de la substance (ECHA, 2022). Cette étude datant de 1996 est la plus récente à ce jour concernant le potentiel mutagène sur bactéries du 2-CE et la seule qui puisse être considérée comme réglementairement recevable. Elle est notée 2 dans la cotation de Klimisch (fiable avec restrictions) et est considérée comme « étude clé » par l'ECHA. L'essai a été réalisé par le JETOC (Japanese Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre) conformément aux lignes directrices du Ministère du travail japonais et selon le protocole établi par Ames *et al.* 1975, Maron and Ames (1983) and (*i.e.*, selon un protocole quasi similaire à celui de la ligne directrice OCDE N°471). En revanche le statut BPL de l'étude n'est pas spécifié. L'étude de mutagenèse a été réalisée dans 2 essais indépendants (2 boîtes/dose) par la méthode de pré-incubation sur 4 souches de *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA1535 et TA1537 et sur la souche d'*E. coli* WP2 uvrA, avec et

sans activation métabolique (S9 mix). Le 2-CE (pureté 99,2 %) a été testé en solution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une gamme de doses allant de 50 à 5 000 µg/boîte. Le 2-CE ne présente pas de cytotoxicité à la dose maximale de 5 000 µg/boîte. Des témoins négatifs et positifs de référence ont été inclus dans chaque essai. Les résultats montrent une augmentation significative de la fréquence des révertants uniquement dans la souche d'*E. coli* WP2 uvrA avec S9 mix. Dans les conditions expérimentales testées, le 2-CE est donc mutagène sur *E. coli* WP2 uvrA (induction de substitutions de paires de bases) avec activation métabolique.

D'autres études ont donné des résultats positifs sur *Klebsiella pneumonia* (Voogd and van der Vet, 1969; Voogd, 1973, cités dans NTP, 1985) et négatifs sur *Streptomyces coelicolor* (Bignami *et al.*, 1980 a,b, cités dans NTP, 1985).

Sur eucaryotes non-mammifères

Le 2-CE induit des mutations géniques sur *Aspergillus nidulans* (Bignami *et al.*, 1980 a,b, cités dans NTP, 1985). Cependant, aucune mutagénicité n'a été notée sur *Schizosaccharomyces pombe*, et *Drosophila melanogaster* (Knaap *et al.*, 1982, cité dans NTP 1985 ; NTP 1985).

Sur cellules de mammifères

Le potentiel mutagène du 2-CE a été testé sur cellules de hamster chinois V79 au locus HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) après 3 h de traitement en absence d'activation métabolique (Huberman *et al.*, 1975). Aux doses ≤ 2 500 µM, aucune augmentation de la fréquence de mutations n'a été observée. Dans cette étude, le 2-CAA quant à lui s'est avéré positif dès la moyenne dose testées de 6,4 µM.

Une étude similaire a été réalisée par Knaap *et al.* (1982) sur cellules de lymphome de souris L5178Y au locus HGPRT après 2 h de traitement, sans activation métabolique. Aux doses testées de 10 et 100 mM, le 2-CE n'a induit aucune augmentation de la fréquence de mutations.

3.4.3.2.3. Aberrations chromosomiques

Un test d'aberrations chromosomiques et un test d'échanges de chromatides sœurs (SCE) ont été réalisés avec le 2-CE (pureté 99 %) par Ivett *et al.* (1989) sur cellules ovariennes de hamster chinois CHO-WBL, avec et sans activation métabolique (S9 de foies de rats induits à l'arochlor 1254). Des témoins positifs et négatifs ont également été testés. Les résultats montrent, dans le test SCE en absence de S9 (25 h de traitement), des réponses jugées significatives à partir de 1 200 µg/mL. Un retard dans la progression du cycle cellulaire a été observé à des doses ≥ 5 000 µg/mL. En présence de S9 (2 h de traitement), une réponse positive a été observée à des doses plus faibles (119,1 et 396,6 µg/mL). Le 2-CE a également induit des aberrations chromosomiques (le type d'aberrations chromosomiques n'est pas indiqué dans l'étude). En absence d'activation métabolique (8 h de traitement), des augmentations significatives du pourcentage d'aberrations chromosomiques ont été détectées uniquement à des doses bien supérieures aux limites acceptables du protocole (*i.e.*, 5 000 µg/mL) (données non présentées dans l'étude). En présence d'activation métabolique (2 h de traitement), des augmentations significatives du pourcentage d'aberrations chromosomiques à 980 et à 2 000 µg/mL ont été obtenues après un temps de récolte retardé (en raison du retard du cycle cellulaire observé précédemment dans le test SCE).

Plus récemment, le potentiel génotoxique du 2-CE et du 2-CAA ont été évalués dans un test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur cellules de hamster chinois CHO-K1, en présence ou non d'un système exogène d'activation métabolique (S9 de foies de rats induits par l'arochlor 1254), après un temps long de traitement sans période de recouvrement (24h/+0h) (Liao *et al.*, 2011). Un essai préliminaire de toxicité (données non présentées dans l'étude) a été réalisé et a permis de déterminer les doses à utiliser pour l'essai principal de génotoxicité, à savoir 50, 75 et 100 % de la CL50 (concentration létale qui induit 50 % de cytotoxicité), soit 5, 7,5 et 10 mM pour le 2-CE, et 0,175, 0,263 et 0,35 mM pour le 2-CAA. Des témoins positifs (ethyl methane sulfonate sans S9 et cyclophosphamide avec S9) et négatif ont été inclus. En absence d'activation métabolique, les résultats ne montrent aucune augmentation significative de la fréquence d'aberrations chromosomiques, ni pour le 2-CE ni pour le 2-CAA. En revanche, en présence d'activation métabolique, une augmentation statistiquement significative de la fréquence d'aberrations chromosomiques (60,5 % de gaps de chromosomes, 20,1 % de cassures de chromosomes et 19,4 % d'échanges de chromosomes) a été observée uniquement pour le 2-CAA (à la moyenne et forte dose).

Dans son récent avis relatif à la toxicité du 2-CE, l'EFSA (2022) fait référence à un test du micronoyau *in vitro* réalisé sur cellules hépatiques HepaRG dont le résultat est négatif. Néanmoins, comme le souligne les experts de l'EFSA, la lignée cellulaire HepaRG est une lignée cellulaire non standard pour le test du micronoyau, qui n'a pas été entièrement validée pour la détection des micronoyaux et dont l'utilisation doit être justifiée en démontrant sa performance dans le test selon les critères d'acceptabilité décrits dans la ligne directrice d'essai 487 de l'OCDE (2016). En outre, l'EFSA a également noté que, bien que les cellules HepaRG expriment des niveaux élevés d'enzymes du métabolisme, un excès de glutathion (GSH) peut être généré dans les cellules immortalisées telles que les cellules HepaRG (Xu *et al.*, 2018, Mitchell et Russo, 1987, cités dans EFSA, 2022). Par conséquent, ce résultat négatif dans le test micronoyau *in vitro* sur HepaRG doit être analysé avec prudence. Comme déjà noté par le BfR (2021), l'équilibre entre la formation de métabolites réactifs tels que le 2-CAA et la détoxification *via* la conjugaison au GSH pourrait jouer un rôle majeur dans la mutagénicité potentielle du 2-CE.

Le 2-CE n'induit pas d'aberrations chromosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae* (Loprieno *et al.*, 1977, cité dans NTP, 1985).

3.4.3.2.4. Autres tests

Récemment Wills *et al.* (2021) ont utilisé le test de screening ToxTracker® (Toxys) pour étudier le potentiel génotoxique de 17 agents alkylants, dont le 2-CE, et composés aromatiques aminés. Ce test innovant est un test de criblage à haut débit permettant d'étudier simultanément un grand nombre de molécules (Hendriks *et al.*, 2012, 2016). Toxtracker® présente l'avantage d'apporter des informations sur les mécanismes d'action (géo)toxiques puisque son principe repose sur l'utilisation de différentes lignées de cellules souches embryonnaires de souris génétiquement stables associées à différents biomarqueurs de génotoxicité (dommages à l'ADN), de stress cellulaire (médié par la protéine p53), de stress oxydatif et de stress protéique. Les résultats de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence une activation des voies de signalisation induites par les dommages à l'ADN suite au traitement des cellules par le 2-CE. Le 2-CE est donc considéré comme non génotoxique dans ce test.

Magkoufopoulou *et al.* (2012) ont développé un test *in vitro* basé sur une étude transcriptomique permettant de prédire la génotoxicité *in vivo* des produits chimiques. D'après les données de la littérature, 12 substances classées génotoxiques *in vivo* et 22 substances classées non-génotoxiques *in vivo* (dont le 2-CE) ont été sélectionnées. Les altérations transcriptomiques induites dans la lignée cellulaire humaine HepG2 après un traitement de 24 ou 48 h avec ces substances ont été comparées afin de sélectionner des ensembles de gènes (signature transcriptomique) capables de prédire la génotoxicité *in vivo* (c'est-à-dire de distinguer les génotoxiques *in vivo* des non-génotoxiques *in vivo*). Trois méthodes de prédiction ont été développées. Les résultats ont montré une classification erronée du 2-CE dans la moitié des cas (3/6). De plus, alors que la méthode la plus prédictive présentait une concordance de 89 %, une spécificité de 87 % et une sensibilité de 91 %, le 2-CE était mal classé par cette méthode et a été prédit génotoxique *in vivo*. L'étude a également montré que les gènes principalement dérégulés pour le 2-CE étaient impliqués dans les processus métaboliques.

Sakai *et al.* (2010) ont testé la capacité du 2-CE (parmi 98 produits chimiques), à induire la transformation cellulaire, en tant qu'initiateur ou promoteur de tumeur. Ce test est réalisé avec des cellules Bhas 42 obtenues à partir de cellules BALB/c 3T3 transfectées avec la séquence de l'oncogène viral RAS (v-Ha-RAS). Le 2-CE a été jugé négatif à la fois dans l'essai d'initiation et dans l'essai de promotion.

3.4.3.3. Études *in vivo*

3.4.3.3.1. Domages à l'ADN

La génotoxicité *in vivo* du 2-CE a été étudiée dans un test de déroulement de l'ADN à pH alcalin (mise en évidence de cassures simples brins et de lésions alcali labiles uniquement) sur cellules hépatiques après traitement unique de souris B6C3F1 mâles par voie intraveineuse à des doses de 2-CE allant de 0,3 à 1,2 mmol/kg p.c. (soit de 24,16 à 96,6 mg/kg p.c.). Les animaux ont été sacrifiés 4 h après le traitement. Dans les conditions testées, les résultats ne montrent aucune augmentation de la fragmentation de l'ADN (Storer and Conolly, 1985).

Allavena *et al.* (1992) ont utilisé une batterie de 3 tests de génotoxicité *in vivo* (test du micronoyau, test UDS et test d'éluion alcaline) afin de vérifier si les résultats obtenus par ces tests *in vivo* concordaient avec ceux obtenus *in vitro* ou ceux obtenus dans les études de cancérogenèse de 2 ans chez le rongeur. Plusieurs produits, dont le 2-CE, *a priori* génotoxiques/mutagènes *in vitro* et non cancérogènes chez le rongeur ont été sélectionnés. Concernant les tests de lésions primaires de l'ADN, 3 protocoles ont été mis en œuvre. Dans le premier protocole, des rats Sprague-Dawley albino mâles (5 animaux/groupe) ont reçu par voie orale (gavage) 2 doses successives de 2-CE en solution dans de la carboxyméthylcellulose (CMC) à 1 % à raison de la moitié de la DL₅₀ à chaque administration (soit 2 fois 45,5 mg/kg p.c.), le second traitement ayant eu lieu 24 h après le premier. Les animaux ont été sacrifiés 6 h après le second traitement. Des cultures d'hépatocytes primaires ont été préparées puis les sites de réparation de l'ADN et/ou les lésions primaires de l'ADN ont été évaluées 20 h (test UDS), et 4 h et 20 h (test d'éluion alcaline) après l'ensemencement des cellules. Dans le deuxième protocole, les rats ont été traités au 2-CE à 45,5 mg/kg p.c. et sacrifiés 2 h plus tard, puis des cultures d'hépatocytes primaires ont été préparées et les tests

d'éluotion alcaline et UDS ont été réalisés aux mêmes temps que ceux du protocole précédent. Dans le troisième protocole, des cultures d'hépatocytes primaires préparées à partir de rats non exposés au 2-CE ont été traitées pendant 20 h avec des concentrations sub-toxiques logarithmiques de 2-CE puis immédiatement utilisées pour les tests d'éluotion alcaline et UDS. Un groupe témoin négatif et un groupe témoin positif ont été inclus dans chaque essai. Les résultats de ces 3 schémas de traitement n'ont montré aucune fragmentation de l'ADN ni aucune synthèse non programmée de l'ADN, le 2-CE a donc été rapporté comme non génotoxique dans ces conditions expérimentales.

Kitchin *et al.* (1992) ont sélectionné 111 produits chimiques connus pour leur cancérrogénicité ou non chez les rongeurs. Ils les ont testés dans 4 tests *in vivo* afin d'évaluer l'utilité de cette batterie pour prédire ou confirmer la cancérrogénicité chez les rongeurs. Les tests ont été sélectionnés de par leur complémentarité à détecter les agents cancérrogènes génotoxiques et non génotoxiques : cytotoxicité (activité de l'alanine aminotransférase sérique), promotion (activité de l'ornithine décarboxylase hépatique et contenu hépatique en cytochrome P450) et dommages à l'ADN (test d'éluotion alcaline sur cellules hépatiques). Des rats Sprague-Dawley femelles (8 ou 9 animaux/groupe) ont été exposés au 2-CE par gavage à des doses de 18 et 54 mg/kg p.c., 4 h ou 21 h avant le sacrifice. Les résultats ont montré que le 2-CE induit une augmentation des activités de l'alanine aminotransférase et de l'ornithine décarboxylase mais n'induit pas les CYP450 et ne provoque pas de lésions primaires de l'ADN.

3.4.3.3.2. Mutations géniques

Aucun test de mutations géniques *in vivo* n'a été rapporté à ce jour dans la littérature.

3.4.3.3.3. Aberrations chromosomiques

Isakova *et al.* (1971, cité dans NTP, 1985) ont montré que le 2-CE augmentait la fréquence d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de rats exposés par inhalation au 2-CE, mais aucune donnée détaillée n'a été fournie par les auteurs.

D'après l'étude de Conan *et al.* (1979), le traitement de souris Swiss mâles (3 à 5 animaux/groupe) au 2-CE par voie intrapéritonéale (IP) à raison de 2 injections (0,05 mL/kg p.c.) à 24 h d'intervalle suivi du sacrifice des animaux 6 h après le dernier traitement n'a induit aucune formation d'aberrations chromosomiques dans les cellules de moelle osseuse. Les auteurs ont également effectué un test du micronoyau sur moelle osseuse selon le même schéma de traitement que précédemment, par voie orale (0,025 ; 0,050 ; 0,075 et 0,100 mL/kg p.c.) et par voie IP (0,01 et 0,05 mL/kg p.c.). Les résultats n'ont montré aucune augmentation de la fréquence de cellules micronucléées sauf à la forte dose (mais l'augmentation restait statistiquement non significative).

Dans l'étude de Allavena *et al.* (1992) (voir partie 3.4.3.3.1. sur les dommages à l'ADN *in vivo*), 2 tests du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse ont été réalisés selon des protocoles différents. Le premier protocole prévoyait l'administration par gavage de 2-CE dans une solution aqueuse de CMC à 1 % à des rats mâles albino Sprague-Dawley (5 animaux/groupe), à raison de la moitié de la DL50 (soit 45,5 mg/kg p.c.), 20 h après une hépatectomie partielle (2/3 du foie). Les animaux ont été sacrifiés 48 h plus tard puis les cellules micronucléées ont été dénombrées dans le foie et la moelle osseuse des animaux. Dans le second protocole, les

rats ont reçu 2 doses successives de 2-CE (2 fois 45,5 mg/kg p.c.), le second traitement ayant eu lieu 24 h après le premier. Les animaux ont été sacrifiés 6 h après le second traitement et les cellules micronucléées ont été dénombrées dans la moelle osseuse. Un groupe témoin négatif et un groupe témoin positif ont été inclus dans l'essai. Dans les 2 protocoles, les résultats ont montré que le 2-CE n'était pas génotoxique car aucune augmentation de la fréquence de micronoyaux n'a été observée.

Un test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse de rongeurs a également été réalisé par Shelby *et al.* (1993). Cette étude est particulièrement intéressante car relativement bien conduite. Des souris B6C3F1 mâles (5 animaux/groupe) ont reçus 3 injections consécutives de 2-CE (en solution dans du PBS) par voie IP à 24 h d'intervalle aux doses de 25, 50 et 100 mg/kg p.c. Les doses ont été choisies d'après une étude préliminaire de toxicité ou d'après la solubilisation de l'élément d'essai dans le véhicule (les auteurs n'ont pas fourni davantage de précision pour le 2-CE). Des groupes témoin négatif et témoin positif ont été inclus. Les animaux ont été sacrifiés 24 h après le dernier traitement. L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés a été déterminée sur la base de l'examen de 4 000 érythrocytes immatures par animal. Les résultats n'ont montré aucune augmentation de la fréquence de micronoyaux, le 2-CE n'étant donc pas génotoxique dans les conditions testées.

Liao *et al.* (2011) ont réalisé un test du micronoyau *in vivo* sur sang périphérique de souris ICR mâles (5 animaux/groupe) exposées par voie IP au 2-CE à des doses de 10, 20 et 40 mg/kg p.c. ou au 2-CAA à des doses de 0,75, 1,5 et 3 mg/kg p.c. Les doses correspondant à 1/8, 1/4 et 1/2 de la DL50 (dose létale 50 %) ont été choisies d'après l'étude de Allavena *et al.* (1992). Aucune mortalité n'a été observée. Les différents groupes d'animaux ont été sacrifiés 48 h ou 72 h après le traitement. Des témoins négatif (véhicule : DMSO) et positif (cyclophosphamide) ont été inclus dans les essais. Les résultats ont montré que le 2-CE n'induit pas la formation de micronoyaux, excepté à la forte dose (40 mg/kg p.c.) pour le temps long (72h). En revanche le 2-CAA a induit une augmentation statistiquement significative de la fréquence de micronoyaux comparé au groupe témoin négatif, dès la faible dose et aux 2 temps de prélèvement. Les auteurs ont conclu que la métabolisation du 2-CE en 2-CAA jouait un rôle important dans sa toxicité.

Un test de translocation héréditaire et un test de dominance létale chez la souris ont donné des résultats négatifs démontrant ainsi l'absence d'aberrations chromosomiques sur cellules germinales après traitement au 2-CE (Epstein *et al.*, 1972, Sheu *et al.*, 1983, cités dans NTP, 1985).

3.4.4. Effets du 2-CE à faibles doses et notion de seuil de toxicité

Les études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que la métabolisation du 2-CE en 2-CAA jouait un rôle important dans sa génotoxicité et/ou mutagénicité. En effet, les résultats des études *in vitro* ont montré que l'effet génotoxique et mutagène du 2-CE est plus important, voire exclusivement observé, en présence d'activation métabolique, indiquant ainsi que le 2-CE est un agent pro-mutagène et que sa positivité dans le test d'Ames et dans le test d'aberrations chromosomiques est liée à la formation d'un métabolite réactif intermédiaire, le 2-CAA. *In vivo*, les résultats n'ont pas mis en évidence d'effet génotoxique du 2-CE, à l'exception d'une étude à forte dose. En revanche le potentiel clastogène du 2-CAA a été observé dès les faibles doses.

Comme précédemment décrit dans la partie 3.4.1 (Métabolisme), le 2-CE est métabolisé en 2-CAA par l'alcool déshydrogénase cytoplasmique qui est ensuite conjugué au glutathion (GSH) par une glutathion-S-transférase. L'activité de l'alcool déshydrogénase hépatique est quantitativement la plus importante de l'organisme, ce qui permet de conclure que, lors du premier passage hépatique, une biotransformation importante du 2-CE a lieu au niveau du foie. L'ensemble de ces réactions enzymatiques se passe dans le cytoplasme de la cellule et donc à distance du noyau et donc de l'ADN.

Lors de la conjugaison du 2-CAA au GSH, le métabolite S-carboxyméthyl-GSH formé est dépourvu d'activité génotoxique puisque le site électrophile de la molécule est bloqué par une liaison covalente au GSH. De plus, on sait aussi qu'il existe, à faibles doses, un « seuil métabolique » au-dessous duquel aucun effet génotoxique ne peut se produire, la teneur en glutathion réduit étant suffisamment importante pour détoxifier le métabolite intermédiaire réactif. En revanche, à fortes doses, au-dessus de ce seuil, un effet génotoxique correspondant à l'épuisement des réserves en GSH est observé. Un cas similaire qui a été largement étudié est celui de l'acétaminophène (ou paracétamol) dont le principal métabolite produit par les cytochromes P450 hépatiques est la N-acétyl para-benzoquinone-imine (NAPQI). A doses thérapeutiques, la NAPQI est détoxifiée par le GSH hépatique et ne présente donc pas de risque mutagène et cancérigène. En revanche, lors d'une intoxication aiguë (correspondant à une dose de paracétamol ≥ 150 mg/kg p.c., soit environ 7,5 g chez l'adulte, en 24 heures), le surdosage entraîne un épuisement des réserves hépatiques de GSH, et *in fine* des effets génotoxiques et hépatotoxiques peuvent survenir. La revue de Müller et Kasper (2000) sur les seuils dans l'évaluation du risque en génotoxicité reprend d'ailleurs cet exemple. Les auteurs indiquent que des résultats positifs biologiquement non pertinents peuvent être obtenus *in vitro* en raison de conditions ou de voies métaboliques particulières qui ne seraient pas applicables chez l'Homme aux faibles niveaux d'exposition. L'acétaminophène produit une quinone-imine électrophile efficacement conjuguée au GSH pour des expositions thérapeutiques et pour laquelle il y existe un seuil de conjugaison, qui lorsqu'il est dépassé, génère des résultats positifs par exemple dans des tests à des niveaux d'exposition significativement plus élevés que les expositions humaines normales. De même, la formation d'adduits à l'ADN dans les hépatocytes humains traités au paracétamol n'a été détectée que dans des conditions d'épuisement du glutathion. Ainsi, des résultats positifs obtenus *in vitro* ou *in vivo* avec des produits qui sont réellement génotoxiques mais qui sont conjugués efficacement au GSH pour empêcher la réaction avec l'ADN à des niveaux d'exposition humaine normaux, peuvent s'avérer ne pas être biologiquement pertinents. Ainsi, il apparaît que dans le cas d'un produit métabolisé en un métabolite réactif génotoxique mais rapidement conjugué au glutathion, il n'existe pas de risque génotoxique pour une exposition aux faibles doses.

L'existence d'un seuil métabolique pour le 2-CE est donc tout à fait envisageable et est confortée par les études de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* effectuées notamment par Liao *et al.* (2011). *In vitro*, le 2-CE (testé à des doses de 5, 7,5 et 10 mM) et le 2-CAA (testé à des doses de 0,175, 0,263 et 0,350 mM) ne sont pas clastogènes sur cellules CHO-K1 sans activation métabolique, alors que le 2-CAA est clairement positif aux deux plus fortes doses étudiées de 0,263 et 0,350 mM en présence d'activation métabolique. Il apparaît donc que bien que le 2-CAA est génotoxique mais que la génotoxicité de ce métabolite peut être neutralisée (par conjugaison au GSH) à faibles doses. *In vivo*, Liao *et al.* (2011) ont également montré que l'administration par voie IP de 2-CE à des souris n'induisait la formation de micronoyaux qu'à

la forte dose de 40 mg/kg p.c et au temps long de 72 h après le traitement, mais pas au temps court de 48h. A la dose moyenne de 20 mg/kg p.c. une augmentation (non statistiquement significative) de la fréquence de micronoyaux a également été observée à 72h, alors qu'aucun effet n'a été noté à la dose la plus faible de 10 mg/kg p.c. En revanche, l'administration de 2-CAA a induit une réponse positive aux 3 doses testées de 0,75, 1,5 et 3 mg/kg p.c. et au 2 temps de prélèvement. Cette étude démontre bien, d'une part qu'il existe une dose seuil de 2-CE (ici de 10 mg/kg p.c. par voie IP) et donc de son métabolite mutagène le 2-CAA lorsqu'il est produit par le métabolisme, mais que d'autre part, *in vivo*, si l'apport exogène (bolus) de 2-CAA dépasse les capacités de conjugaison, on obtient une réponse positive dans le test du micronoyau.

Ainsi, il est possible de conclure que les effets génotoxiques du 2-CE observés dans les tests décrits précédemment présenteraient un seuil métabolique dans la relation dose-réponse. Cela passerait par la métabolisation du 2-CE en 2-chloroacétaldéhyde, métabolite génotoxique et sa détoxification par conjugaison au glutathion cellulaire. Ainsi, les faibles doses ne présenteraient pas de potentiel génotoxique significatif.

3.4.5. Approche de type WoE (Weight of Evidence, poids de la preuve)

Compte tenu de la très importante base de données publiées, la multiplicité des systèmes d'essai et leur différent niveau d'organisation (bactéries, cellules, animaux) ainsi que les paramètres biologiques (*endpoints*) mesurés, une approche de type WoE (Weight of Evidence, poids de la preuve) a été jugée pertinente pour évaluer l'ensemble de ces résultats (Brusick *et al.*, 2016 ; OCDE, 2017).

En 2016, un panel d'experts en génotoxicité a publié une évaluation de la génotoxicité indiquant les « endpoints » à partir desquels les principes de poids de la preuve (WoE) sont compatibles. Les poids de la preuve suivants ont été attribués caractérisés selon les 4 catégories :

- Poids négligeable (Negligible weight) : le paramètre d'évaluation ou l'effet investigué n'est pas lié à un effet néfaste ayant une incidence sur le danger / risque génotoxique ou cancérogène et, en tant que tel, il n'est pas considéré comme une preuve de génotoxicité.

- Faible poids (Low weight) : l'effet investigué 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).

- Poids modéré (Moderate weight) : l'effet investigué est potentiellement pertinent dans le processus de cancérogenèse mais il peut être lié à des mécanismes secondaires considérés 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 cancérogène.

- Poids élevé (High weight) : l'effet investigué est celui qui a été démontré avec un haut niveau de confiance comme jouant un rôle critique dans le processus de cancérogenèse.

Selon ces principes, les résultats du test d'Ames et ceux des tests du micronoyau, d'aberrations chromosomiques et de mutations 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* (micronoyau, aberrations chromosomiques et mutations géniques sur cellules de mammifère).

Comme indiqué dans le document de l'OCDE (2017) 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.

3.4.6. Résultats de l'approche de type WoE pour le 2-CE

Etant donné que la grande majorité des études expérimentales sont très anciennes et qu'elles ont été conduites avant la mise en place du référentiel BPL et des directives de l'OCDE, la pertinence et la qualité des résultats sont limitées. Dans ces conditions et dans le contexte d'une demande en urgence, pour chaque étude individuellement, le niveau global (robustesse du protocole et reproductibilité des effets) n'a pas été pris en considération dans cette approche de type WoE, c'est-à-dire qu'aucune étude n'a été classée comme équivoque en raison de sa faible fiabilité. Les résultats ont été considérés soit positifs, soit négatifs.

Les études et les résultats sont présentés plus en détail dans l'Annexe 4 et sont présentés en résumé dans les tableaux 1 et 2. Pour chaque effet sont indiqués le nombre d'études concernées et le type de résultat (positif en rouge, négatif en vert).

Tableau 1 : Résultats de l'approche de type WoE pour le 2-CE

Endpoint (effet)	Negligible Weight		Low Weight		Moderate Weight		High Weight	
DNA binding (adduct formation) <i>in vitro</i>			0	0				
DNA binding (adduct formation) <i>in vivo</i>			0	0				
SSB/DSB <i>in vitro</i> (including comet)			0	0				
SSB/DSB <i>in vivo</i> (including comet)					4	0		
SCEs <i>in vitro</i>	0	1						
SCEs <i>in vivo</i>	0	0						
Oxidative DNA damage <i>in vitro</i>			0	0				
Oxidative DNA Damage <i>in vivo</i> (detection of 8-OHdG adducts)					0	0		

DNA repair effects <i>in vitro</i>		2	2		
DNA repair effects <i>in vivo</i>			0	0	
Micronuclei <i>in vitro</i>			1	0	
Micronuclei <i>in vivo</i> (including human studies)					3 1
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i>			1	1	
Chromosomal aberrations <i>in vivo</i> (including human studies)					3 1
Gene mutation in bacteria (Ames' Test)					4 17
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i>			2	0	
Gene mutation <i>in vivo</i>					0 0

Tableau 2 : Synthèse du nombre d'études réalisées sur le 2-CE menant à des résultats positifs (rouge) et négatifs (verts) en fonction de la catégorie de poids.

	Negligible weight	Low weight	Moderate weight	High weight
<i>Négatif</i>		2	8	10
<i>Positif</i>	1	2	1	19

Ainsi, les méthodes d'essai existantes dans la littérature sur la génotoxicité du 2-CE sont principalement de poids élevé (« high weight ») et ont généré 19 réponses positives (65,5 %) et 10 réponses négatives (34,5 %). Sur ces 29 études de poids élevé, 21 d'entre elles sont des tests de mutations géniques sur bactéries (test d'Ames) dont 17 sont positives.

La 2^{ème} catégorie de tests la plus représentée est celle de poids modéré (« moderate weight ») avec 9 études dont 8 négatives et 1 positive.

Par ailleurs, si l'on combine les 2 catégories de poids fort et modéré, on obtient 18 réponses positives et 20 réponses négatives, soit une répartition quasiment équivalente.

L'analyse des études par l'approche WoE permet donc de conclure que le 2-CE est bien mutagène *in vitro* sur bactéries mais ne permet pas de conclure sur le potentiel génotoxique/mutagène *in vivo* du 2-CE.

En conclusion, l'examen critique de l'ensemble des données disponibles dans la littérature et leur pondération selon l'approche WoE (poids de la preuve) laisse suggérer que le 2-CE est un agent génotoxique mutagène *in vitro* et non génotoxique *in vivo*. L'équilibre entre la formation du 2-chloroacétaldéhyde, métabolite réactif mutagène, et sa détoxification *via* la conjugaison au glutathion pourrait jouer un rôle majeur dans la mutagénicité du 2-CE. Il est connu que dans le cas d'un produit métabolisé en un métabolite réactif génotoxique mais

rapidement conjugué au glutathion, il existe un seuil métabolique en-dessous duquel il n'y a pas d'effet. L'existence d'un seuil métabolique pour le 2-CE est donc tout à fait envisageable, mais à ce jour il n'a pas été démontré spécifiquement par des études de génotoxicité.

Compte tenu de la faible qualité des données existantes, de l'absence d'étude *in vivo* robuste et conforme aux réglementations actuelles, et de l'analyse critique faite de l'ensemble des données sur la génotoxicité, le GECU 2-CE conclut qu'il est dans l'impossibilité de statuer quant au caractère génotoxique du 2-CE.

3.4.7. Toxicité sur la reproduction et le développement

3.4.7.1. Chez le rat

Dans une étude citée par l'ECHA (2019), Ericsson and Youngdale (1970) ont exposé 3 rats mâles par gavage à 30 mg/jour de 2-CE pendant 8 jours. L'accouplement avec des femelles non-exposées a eu lieu un jour après la dernière exposition. L'activité sur la fertilité a été évaluée par le nombre d'implantations au 9^{ème} ou 10^{ème} jour de la gestation. Aucun effet sur la fertilité des mâles n'a été mis en évidence à cette dose (le détail des résultats n'est pas fourni, seul un résumé est disponible sur le site de l'ECHA).

3.4.7.2. Chez la souris

Dans une étude de fœto-embryo-toxicité et de tératogenèse, Courtney *et al.* (1982, rapporté par l'US-EPA (2012)) ont administré du 2-CE dans de l'eau par gavage à 12 souris CD-1 gravides/groupe de dose à des doses de 0, 50, 100 ou 150 mg/kg p.c./jour dans un volume de 0,1 mL/souris/jour, pendant les jours 6 à 16 de gestation. Les doses ont été calculées sur la base des poids corporels au 6^{ème} jour de gestation. Il n'a pas été indiqué si la stabilité du composé d'essai était confirmée dans le véhicule, et la fréquence de préparation des solutions de dosage n'était pas indiquée. Toutes les souris ont été sacrifiées au 17^{ème} jour de gestation. À 150 mg/kg p.c./jour, 75 % des souris maternelles sont mortes, généralement après 2 à 4 traitements, et les 25 % restants n'étaient pas gravides. À 100 mg/kg p.c./jour, le gain de poids corporel de la mère a été diminué ($p \leq 0,05$) de 61 % et le poids corporel du fœtus a diminué ($p \leq 0,05$) de 14 %. À 100 mg/kg p.c./jour, le poids absolu et relatif du foie des fœtus a diminué ($p \leq 0,05$) de 19 % et 9 %, respectivement. Ces résultats ont été considérés comme étant la conséquence de la diminution du poids corporel du fœtus. Une diminution mineure ($p \leq 0,05$) du poids relatif du foie chez les fœtus à 50 mg/kg p.c./jour de 6 % a également été notée. Cette constatation n'a pas été considérée comme biologiquement pertinente. Les auteurs de l'étude n'ont pas défini de NOAEL ou de LOAEL. Les mères traitées à la dose de 50 mg/kg p.c./jour n'ont montré aucun effet lié au traitement. Par conséquent, ce niveau de dose est considéré comme la NOAEL maternelle. La LOAEL maternelle est de 100 mg/kg p.c./jour, basée sur une diminution du gain de poids corporel maternel. Les fœtus traités à 50 mg/kg p.c./jour n'ont montré aucun effet lié au traitement. Par conséquent, ce niveau de dose est considéré comme la NOAEL pour le développement. La LOAEL pour le développement est de 100 mg/kg p.c./jour, basée sur la diminution du poids corporel du fœtus.

Dans une étude complémentaire de toxicité pour le développement, Courtney *et al.* (1982, rapporté par l'US-EPA (2012)) ont administré du 2-CE dans l'eau de boisson de souris CD-1 présumées gravides à des doses nominales de 0, 10, 25, 50 ou 200 mg/kg p.c./jour pendant les jours 6 à 16 de gestation. L'apport réel, rapporté par les auteurs de l'étude, était de 0, 16,

43, 77 ou 227 mg/kg p.c./jour, et le nombre de souris gravides pour lesquelles des données ont été rapportées était de 16, 3, 3, 4 et 13 par dose/groupe, respectivement. Il n'a pas été indiqué si la stabilité du composé d'essai était confirmée dans le véhicule, et la fréquence de préparation des solutions de dosage n'était pas indiquée. Toutes les souris ont été sacrifiées au 17^{ème} jour de la gestation. Il n'y avait aucune différence significative dans les paramètres maternels ou fœtaux à aucun niveau de dose par rapport au groupe témoin recevant uniquement de l'eau potable, et aucun effet tératogène n'a pu être attribué au 2-CE. L'étude par gavage réalisée par les mêmes auteurs (citée plus haut) a probablement induit des concentrations sanguines transitoires de 2-CE plus élevées que l'étude de ce produit ajouté dans l'eau de boisson, ce qui peut entraîner des effets plus graves. La NOAEL maternelle et développementale de 227 mg/kg p.c./jour (la dose la plus élevée testée) peut être retenue pour cette étude. Aucune LOAEL n'a pu être identifiée.

3.4.7.3. Chez le lapin

Dans une autre étude de tératogenèse rapportée par l'ECHA (LaBorde *et al.* 1982 ; résumé de l'étude sur le site de l'ECHA), des lapins ont été exposés par voie intraveineuse une fois par jour pendant les jours 6 à 14 de la gestation à des doses de 2-CE de 0, 9, 18 et 36 mg/kg p.c./jour. Une augmentation de la mortalité maternelle a été observée dans les groupes expérimentaux, mais aucun effet sur le poids corporel maternel, le poids du placenta ou du foie maternel n'a été observé. Une césarienne a été réalisée au jour 30 de gestation. L'ensemble des paramètres de toxicité liés au développement (nombre d'implants, de sites de résorptions, de fœtus vivants et morts, taille moyenne de la portée et nombre de fœtus présentant des malformations) ont révélé des résultats négatifs. En conclusion de cette étude, aucun effet foetotoxique ou tératogène lié au traitement n'a été constaté après administration par voie intraveineuse (situation pire des cas par rapport aux autres voies d'exposition). Une NOAEL de 36 mg/kg p.c./jour peut être retenue chez le lapin après exposition par voie intraveineuse.

3.4.8. Tolérance locale

Le 2-CE n'est pas irritant pour la peau et ne présente pas de potentiel allergisant au niveau cutané (ECHA). En revanche, il est irritant pour l'œil, plusieurs études citées par l'ECHA ont montré que le 2-CE avait causé des lésions oculaires irréversibles chez le lapin. Le 2-CE ne présente pas de potentiel allergisant de type IV au niveau cutané.

3.4.9. Autres effets - Études mécanistiques

3.4.9.1. Effets cardiovasculaires

Des études ont montré que la cardiotoxicité du 2-CE était liée à la toxicité de son métabolite le 2-CAA qui agirait *via* une surexpression de l'oxyde nitrique synthase dans les oreillettes (Chen *et al.*, 2011).

3.4.9.2. Effets hépatiques

Des études ont démontré que, dans le foie, le 2-CE peut inhiber la synthèse des protéines, altérer la respiration mitochondriale, augmenter les taux de lipides et entraîner la

désagrégation des polysomes (Friedman *et al.*, 1992). Il peut stimuler la respiration mitochondriale en découplant la phosphorylation oxydative (Bhat *et al.*, 1991).

Dans une étude prédictive de cancérogénicité hépatique sur plusieurs substances, des rats Fischer 344 (n=4) âgés de 4 semaines, ont été exposés quotidiennement pendant 28 jours à 40 mg/kg p.c./jour de 2-CE dans l'eau distillée par gavage (Yamada *et al.*, 2016). A la fin de l'étude les animaux ont été sacrifiés et des échantillons de foie ont été prélevés et stockés pour analyse de l'expression génique. Une analyse comparative du transcriptome global par microarrays (ou puces à ADN) a ensuite été effectuée pour examiner les différences d'expression génique de 42 marqueurs entre les animaux traités et les contrôles. Dans les conditions de cette étude, le 2-CE a été classé comme non hépato-cancérogène.

3.4.9.3. Neurotoxicité

La neurotoxicité du 2-CE a été étudiée dans des cultures primaires d'astrocytes de rat. Ce dernier a induit une génération de stress oxydant *via* l'induction du CYP2E1 (Tang *et al.*, 2019), ainsi qu'une altération de la fonction mitochondriale et du métabolisme du glutamate (Sun *et al.*, 2016).

Le 2-CE induit également la surexpression de la metalloprotéinase matricielle 9 (MMP9), impliquée dans les lésions cérébrales et l'œdème cérébral vasogénique (Wang *et al.*, 2018).

3.4.10. Observations chez l'Homme

Plusieurs études détaillant la toxicité aiguë ou la toxicité à court terme du 2-CE chez l'Homme ont été répertoriées par l'US-EPA (2012).

Onze cas d'intoxications par voie respiratoire ont été rapportés par Goldblatt et Chiesman (1944) chez des travailleurs impliqués dans la fabrication du 2-CE. Dans 2 de ces cas, le patient est décédé. Dans les 9 autres cas non-mortels, les symptômes touchaient :

- le système digestif : nausées, douleurs épigastriques, vomissements répétés (de la bile peut apparaître) et selles volumineuses ;
- le système circulatoire : action dépressive sur la circulation et signes de choc dans les cas graves ;
- le système nerveux : maux de tête, vertiges, incoordination, confusion et légers effets narcotiques ;
- le système urinaire : légère albuminurie (disparaissant lors de la récupération) et polyurie ;
- le système respiratoire : présence possible de toux et de rhonchus ;
- la peau : érythème sur la peau des bras et du tronc dans les cas graves.

Deng *et al.* (2001) ont effectué une analyse rétrospective pour évaluer les patients victimes d'un empoisonnement au 2-CE signalés au centre antipoison de Taïwan entre 1985 et 1998. Il y avait 17 patients (11 hommes et 6 femmes) âgés de 2 à 70 ans. Cinq patients ont tenté de se suicider ou se sont suicidés, neuf patients ont été exposés involontairement et trois patients ont été exposés professionnellement. L'ingestion était la voie d'exposition la plus commune (14 patients), tandis que trois patients ont été exposés par voie cutanée et/ou orale, et un patient a été exposé par inhalation. Sept des 17 patients sont décédés dans les 24 heures après avoir présenté des symptômes graves tels qu'une acidose métabolique, une

insuffisance respiratoire, un choc et/ou un coma. La dose ayant entraîné le décès du patient était supérieure à 330 mg/kg. Tous les patients sauf un ont développé des symptômes dans les 2 heures suivant l'exposition. Les patients présentant une intoxication légère à modérée ont eu des effets gastro-intestinaux, cardiovasculaires, respiratoires ou neurologiques (neuf patients) ; des vomissements (cinq patients) ; une tachycardie, une tachypnée, et une faiblesse/léthargie (trois patients) ; nausées, confusion passagère et mal de gorge/gêne buccale (deux patients) ; et étourdissements, oppression thoracique, hypertension transitoire, frilosité, hypokaliémie, et légère altération de la fonction rénale (un patient).

Aucune étude épidémiologique n'a pu être identifiée pour permettre d'évaluer les effets aigus, subchroniques, chroniques, développementaux, reprotoxiques, ou cancérigènes après exposition par voie orale au 2-CE.

Cependant, concernant l'exposition au 2-CE par inhalation, le potentiel cancérigène a pu être évalué à travers de 3 études épidémiologiques (Greenberg *et al.*, 1990 ; Benson and Teta, 1993 ; Olsen *et al.*, 1997) mais aucune d'elles n'a permis de conclure que le 2-CE est cancérigène chez l'Homme (US-EPA, 2012).

3.4.11. Proposition d'une valeur sanitaire de référence

Deux valeurs sanitaires de référence pour le 2-CE ont été proposées par l'US-EPA en 2012 (US-EPA, 2012). Dans cette évaluation, l'étude de toxicité subchronique chez le rat d'Oser (Oser *et al.*, 1975) a été utilisée pour identifier une NOAEL de 45 mg/kg p.c./jour. Cette NOAEL a été utilisée pour dériver une p-RfD (« provisional Reference Dose ») subchronique de 200 µg/kg p.c./jour, en appliquant un ensemble de facteurs d'incertitude d'une valeur de 300 [UFa (variabilité inter-espèces) = 10, UFh (variabilité inter-individuelle) = 10 et un facteur UFd¹³ = 3]. Ce dernier UFd a été appliqué car la base de données comprenait deux études acceptables de toxicité sur le développement chez la souris mais pas d'études acceptables sur la reproduction sur deux générations. La même NOAEL a servi à l'US-EPA pour dériver une p-RfD chronique de 20 µg/kg p.c./jour, en appliquant un ensemble de facteurs d'incertitude de 3000 (UFa = 10, UFh = 10, UFd = 3 pour les mêmes raisons que précédemment et un UFs = 10 car une étude de durée subchronique (Oser *et al.*, 1975) a été utilisée comme étude principale).

D'autres agences d'évaluation comme le BfR (2021) ou l'Efsa (2022), ayant abordé la présence de 2-CE dans les denrées alimentaires, ont conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de données pour dériver un point de départ toxicologique (PoD).

Aucune autre valeur sanitaire de référence plus récente n'a pu être identifiée à partir de la recherche bibliographique conduite pour cette évaluation.

3.4.11.1. Corpus de publications utilisables

Deux publications de toxicité *in vivo* par voie orale étaient disponibles pour essayer d'identifier un PoD et définir une valeur toxicologique indicative¹⁴ (VTi) pour le 2-CE (Oser *et al.*, 1975 ; Ambrose, 1950).

¹³ UFa = inter-species uncertainty factor, UFh = intra-species uncertainty factor, UFd = Data based uncertainty factor, UFs = sub-chronic uncertainty factor

¹⁴ VTi : Repère toxicologique pouvant être utilisé pour une évaluation d'un risque. Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible (ANSES, 2017).

Publication de Oser *et al.* (1975)

Cette étude a été réalisée sur 3 espèces différentes : rats, chiens et singes. Aucun effet statistiquement significatif n'apparaissant pour les études avec les chiens et les singes, l'espèce retenue est donc le rat. L'étude a été menée avec 200 rats albinos (100 mâles et 100 femelles). Chaque animal a été affecté à l'un des 4 groupes exposés (soit 25 mâles et 25 femelles par dose, y compris le témoin). Les animaux ont été maintenus dans des cages individuelles avec de l'eau à volonté. Ils ont été surveillés quotidiennement pour la survie, l'apparence et le comportement. Les doses testées étaient 0 ; 30 ; 45 et 67,5 mg/kg p.c./jour. Lors des 6 premières semaines, les doses de 2-CE étaient administrées *via* l'alimentation. Puis, pour les 12 dernières semaines, l'exposition a été faite par gavage suite à l'observation du manque de stabilité du 2-CE dans l'alimentation. Au cours des trois premières semaines suivant le début de l'administration par gavage, la consommation de nourriture a diminué et une respiration difficile a été observée chez la majorité des rats recevant la dose maximale testée de 67,5 mg/kg p.c./jour. Ces animaux sont devenus moribonds et ont été sacrifiés ; seulement 8 des 25 mâles et 6 des 25 femelles ont survécu jusqu'à la fin de la période d'administration de 12 semaines. Dans l'ensemble (semaines 1 à 12 de l'administration par gavage), le gain de poids corporel a diminué de 34 % chez les mâles et de 10% chez les femelles survivants à la dose maximale testée de 67,5 mg/kg p.c./jour. Aucun autre effet indésirable n'a été signalé pour aucun des paramètres examinés, sauf chez les sujets décédés. Tous les rats ont été autopsiés en fin d'étude. Parmi les animaux morts au cours de l'étude, une coloration sombre du foie, des tissus gastro-intestinaux de couleur sang, des glandes pituitaires et surrénales hémorragiques et des poumons rouges ont été notés. Les animaux vivants en fin d'étude ne présentaient aucun signe suggérant un effet lié à la dose de 2-CE. Les rats du groupe de dose élevée, morts peu de temps après le changement de régime alimentaire, montraient des signes de myocardite, de stéatose hépatique, quelques cas de déplétion thyroïdienne, des congestions de la thyroïde et une forte incidence de congestion pulmonaire. Par une analyse de l'étude faite au moyen du logiciel ToxRTool, le GECU 2-CE conclut à une cotation 2 de Klimisch « Valide avec restriction » pour l'établissement d'une VTR.

Publication de Ambrose (1950)

Il s'agit d'une étude comparative des effets du 2-CE sur des rats en fonction de la voie d'exposition (inhalée, cutanée, orale). Seules les données orales décrites dans cette publication sont considérées pour cette expertise. Onze groupes de 5 rats mâles ont été exposés pendant 220 jours à des doses de 2-CE de 0, 9, 18, 36, 72, 108, 144, 216, 288, 576 ou 1152 mg/kg p.c./jour. Seules les données correspondantes aux 8 plus faibles doses (témoins inclus) sont notées dans la publication, les doses les plus fortes ayant entraîné la mort des animaux entre 7 et 49 jours d'exposition. Le 2-CE a été mélangé à l'alimentation. La consommation alimentaire et le poids des animaux ont été relevés hebdomadairement. A l'issue de l'étude, tous les animaux ont été sacrifiés et leurs tissus soumis à étude histopathologique. Tous les résultats ont été négatifs. Les organes étudiés étaient le cœur, les poumons, le foie, les reins, les surrénales, le pancréas, l'estomac, les intestins, le système urinaire, les testicules et la thyroïde. Seul le gain de poids corporel a été rapporté comme diminuant proportionnellement à la dose, à partir de 108 mg/kg p.c./jour. En outre, la comparaison avec les études par inhalation et par voie cutanée montre une toxicité beaucoup plus élevée avec ces deux autres voies d'exposition.

3.4.11.2. Choix de l'étude clé

Lors de l'évaluation du 2-CE en 2012, l'US-EPA avait retenu la publication de Oser *et al.* (1975) comme étude clé, alors que celle d'Ambrose (1950) n'avait pas été retenue du fait de l'absence de contrôle de la stabilité du 2-CE dans l'alimentation. Pour la même raison et du fait aussi du faible nombre d'animaux exposés, le GECU 2-CE a décidé de privilégier l'étude subchronique de Oser *et al.* (1975) et ceci malgré l'intérêt que présente l'étude de Ambrose (1950) du fait du grand nombre de doses testées et d'une exposition chronique au 2-CE. Néanmoins, malgré ses limitations et son ancienneté, le GECU 2-CE note que l'étude d'Ambrose (1950) suggère une absence de potentiel cancérigène associé à l'exposition par voie orale au 2-CE.

3.4.11.3. Approche d'évaluation de risque appliquée par le GECU au 2-CE

Les résultats de l'évaluation sur le potentiel génotoxique et/ou mutagène du 2-CE, fondée sur une approche de type « poids de la preuve¹⁵ », n'a pas permis au GECU 2-CE de conclure quant au caractère génotoxique/mutagène du 2-CE (section 3.4.3). Par conséquent, le GECU 2-CE a décidé d'étudier la possibilité d'identifier des PoD dans le cas où le 2-CE ne serait pas génotoxique, mais également dans le cas où le 2-CE serait génotoxique.

3.4.11.4. Établissement d'une valeur de référence dans l'hypothèse où le 2-CE ne serait pas génotoxique

Le GECU 2-CE a estimé que dans le temps imparti pour répondre à cette demande d'évaluation en urgence, une valeur toxicologique indicative (VTi) pourrait être élaborée. Par ailleurs, s'agissant d'une situation d'une durée limitée à environ 3 mois, correspondant à la période de contamination dite « critique » du gluten vital avec du 2-CE, le GECU 2-CE a décidé de procéder au calcul d'une VTi subchronique.

Le GECU 2-CE a estimé que les données de Oser *et al.* (1975) permettaient le calcul d'une BMDL (Benchmark dose - lower confidence limit) (Annexe 5). Le calcul a été effectué à partir des données des rats femelles car elles présentent un taux de survie plus bas que les rats mâles. Compte tenu du manque d'information dans la publication sur les variabilités de gain de poids corporel (écart-type), seules les données de survie des animaux sont utilisables pour le calcul d'une BMD.

Le calcul de cette BMDL suit les recommandations de l'Anses en recherchant le meilleur ajustement (ANSES, 2017a). En outre, le meilleur rapport BMDU (Benchmark dose - upper confidence limit) / BMDL a été choisi afin de limiter les incertitudes, expliquant le choix du modèle Gamma. La BMR (Benchmark Response) choisie est celle recommandée par l'Anses et l'EFSA pour les données quantales soit 10 % (ANSES, 2017a ; EFSA, 2016). La BMDL ainsi obtenue est de 43,9 mg/kg p.c./jour, arrondie à **44 mg/kg p.c./jour**.

A partir de ce PoD, une VTi subchronique a été calculée pour le 2-CE en appliquant un facteur d'incertitude global (UF) de 1000. Les facteurs d'incertitude pris en compte pour obtenir l'UF sont les suivants :

- UFa (variabilité inter-espèces) = 10
- UFh (variabilité inter-individuelle) = 10

¹⁵ Ou WoE pour « Weight of evidence »

- + un facteur supplémentaire UFd (insuffisance de données) = 10 pour prendre en compte le fait qu'il existe peu de données toxicologiques orales utilisables, et pour prendre en compte le fait que seules les données de survie ont été retenues comme effet. La valeur de 10 a été retenue dans une optique protectrice.

Dans ces conditions, la VTi subchronique proposée par le GECU 2-CE, dans le cadre de cette demande en urgence, est de **44 µg/kg p.c./jour**.

3.4.11.5. Établissement d'un point de départ (PoD) toxicologique dans l'hypothèse ou le 2-CE serait génotoxique

Classiquement le PoD pour des effets génotoxiques provient d'études de cancérogenèse par voie orale, or, dans le cas de ce travail d'évaluation, il n'a pas été possible d'identifier l'existence de telles études. Dans les études de toxicité subchroniques ou chroniques disponibles, et ce quelle que soit la voie d'exposition, aucun effet cancérogène n'a pu être démontré. Seule l'étude du NTP (1985) montre la présence de papillomes à la plus forte dose testée (100 mg/kg p.c./jour) sans que cela ne soit statistiquement significatif. En outre, l'étude de Ambrose (1950) suggère que les effets toxiques par voie cutanée (comme dans l'étude du NTP mentionnée ci-dessus) sont plus prononcés que ceux obtenus par voie orale. Compte tenu de tous ces éléments, le GECU 2-CE a décidé de retenir la BMDL calculée pour les rats femelles à partir de l'étude de Oser *et al.* (1975) et d'établir un PoD de **44 mg/kg p.c./jour**. En outre, cette valeur paraît suffisamment protectrice puisqu'aucune indication d'un effet cancérogène n'a été notée dans les études disponibles pour cette évaluation.

Le GECU 2-CE a également considéré la possibilité d'appliquer le concept de seuil de préoccupation toxicologique (« Threshold of toxicological concern », TTC) pour les substances génotoxiques, tel que défini par l'Efsa (EFSA, 2012 ; 2019) à l'incident de contamination du gluten avec du 2-CE. L'approche TTC est un outil de sélection appliqué, soit pour l'établissement des priorités, soit pour décider si l'exposition à une substance a une probabilité de provoquer des effets sur la santé (EFSA, 2012). L'approche TTC est utilisée lorsqu'il existe des données limitées/inexistantes sur la toxicité spécifique d'un produit chimique et peut être utilisée dans le cas de substances avec ou sans alertes structurelles pour la génotoxicité et/ou de cancérogenèse ou pour les critères non cancéreux (EFSA, 2019).

Le GECU 2-CE n'a pas considéré approprié l'utilisation du concept TTC génotoxique dans le cas présent pour les raisons suivantes :

- il n'a pas pu être clairement établi par l'approche « poids de la preuve » (WoE) que le 2-CE est génotoxique ;
- des données toxicologiques expérimentales sur le 2-CE existent, bien qu'anciennes, y compris des données sur la génotoxicité et la mutagenèse *in vitro*, et sur la génotoxicité *in vivo* ;
- des données expérimentales suggèrent que le mécanisme d'action du 2-CE serait lié à un métabolisme de phase 1 puis à une conjugaison au glutathion (phase 2) et que, seulement après épuisement du glutathion cellulaire, des effets (*i.e.* génotoxiques) pourraient être observés.

Dans l'hypothèse où le 2-CE serait génotoxique, le GECU 2-CE propose de retenir un PoD de 44 mg/kg p.c./jour ainsi qu'une approche de Marge d'Exposition (MoE) de 10 000 telle que classiquement appliquée par l'Efsa dans le cas de substances génotoxiques (EFSA, 2005).

En conclusion, le GECU propose de retenir :

- **une VTi subchronique de 44 µg/kg p.c./jour dans l'hypothèse où le 2-CE ne serait pas génotoxique ;**
- **une BMDL de 44 mg/kg p.c./jour et une approche MoE de 10 000 dans l'hypothèse où le 2-CE serait génotoxique.**

3.5. Méthodologie pour l'estimation de l'exposition alimentaire au 2-CE

3.5.1. Données de contamination du gluten en 2-CE

3.5.1.1. Recueil des données

Les données recueillies proviennent d'échantillons de plus de 500 lots de gluten vital, plus de 200 lots de gluten soluble et plusieurs dizaines de lots d'autres co-produits (amidon, son) ou d'échantillons collectés en cours de procédé. Ces échantillons ont été collectés entre février 2019 et mars 2022, sur deux sites de transformation de blé de l'entreprise concernée (site 1 et site 2) et analysés par le fabricant pour rechercher la présence de 2-CE suite à sa détection par les préparateurs des mix de gluten destinés à être incorporés dans des farines utilisées pour la fabrication de différents produits finis. Aucune présence de 2-CE dans une dizaine de lots de gluten des deux autres sites de fabrication n'a été détectée.

La procédure d'échantillonnage décrite dans les documents fournis permet d'assurer la représentativité de l'échantillon par rapport au lot échantillonné. Elle prend en compte différentes situations (camions, silos, péniches) avec l'aide d'un automate piloté en mode automatique ou manuel. Les conditions de prélèvements répondent à la Directive 2002/63/CE¹⁶ en ce qui concerne la taille de l'échantillon.

Les conditions de stockage des échantillons de rétention sont peu décrites. Un document mentionne qu'ils sont stockés à température ambiante. La nature des contenants et surtout leur caractère hermétique ne sont pas décrits. L'oxyde d'éthylène (ETO), qui est un gaz, pourrait s'échapper en cas de non herméticité. Le 2-CE, bien que liquide à température ambiante (température d'ébullition de 129 °C) pourrait s'évaporer. Aussi, il est envisageable que les sous-échantillons d'un échantillon composite du lot restent à l'air libre un certain temps avant que leur collecte ne soit finalisée et leur mélange opéré.

En ce qui concerne les échantillons les plus récents, du fait d'une suspicion de présence d'ETO et de 2-CE, les prélèvements ont été placés dans des contenants hermétiques et expédiés aux laboratoires d'analyses.

Les conditions de stockage des échantillons apparaissent adéquates même si un léger doute subsiste quant à l'application des conditions de stockage en contenant hermétique pour les échantillons de rétention au regard de potentielles pertes de composés cibles au cours du temps.

¹⁶ Directive 2002/63/CE de la Commission du 11 juillet 2002 fixant des méthodes communautaires de prélèvement d'échantillons pour le contrôle officiel des résidus de pesticides sur et dans les produits d'origine végétale et animale et abrogeant la directive 79/700/CEE (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

Les nombreuses analyses réalisées en ETO et 2-CE ont été sous-traitées à deux laboratoires accrédités selon le référentiel ISO/IEC 17025:2018¹⁷.

A réception au laboratoire, les prélèvements ont été conservés en froid négatif avant analyse. La préparation avant injection a systématiquement été réalisée dans la carboglace.

Pour un des laboratoires, une recherche internet mentionne que le laboratoire est accrédité en portée flexible¹⁸. La méthode (MP-02840_DE:2021-10) développée par le laboratoire est intitulée « *détermination de l'oxyde d'éthylène et du 2-chloroéthanol dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux* ». Elle semble avoir été revue pour la dernière fois en novembre 2021. Elle met en œuvre une séparation/détection par GC-MS/MS. Préalablement, à partir de 5 g de prise d'essai, l'extraction implique 10 mL d'un mélange H₂O/ACN 95:5 et la purification une SPE dispersive PSA/C18 (stratégie de type QuEChERS). Les éléments transmis sur la validation mentionnent la farine de caroube (représentative du gluten vital et du blé) et le sésame comme matrices modèles. Les niveaux de fortification étaient de 0,10 et 0,01 mg/kg. Les blancs de procédure révèlent une contamination ubiquitaire en 2-CE de l'ordre de 0,005 mg/kg (soit moins que la limite de quantification). Une carte de contrôle de ces niveaux est en place, avec soustraction systématique du niveau de blanc de la série et un critère de rejet de la série au-delà de 0,005 mg/kg.

Pour l'autre laboratoire, la méthode (PV-SA-399) a été revue en janvier 2022 et fait également appel à la GC-MS/MS. Les éléments transmis sur la validation mentionnent « *Food* » comme type de matrice. L'extraction est faite en milieu acide à l'aide d'acide sulfurique, cette description restant vague. Les résultats de participations récentes à trois essais inter-laboratoires (requis par l'ISO 17025) sur du sésame et des épices sont probants. Les matrices utilisées pour la validation sont le xanthane, le sésame et un épaississant à des niveaux de fortification variant de 0,01 à 1 (supposément mg/kg). La problématique de la contamination procédurale n'est pas évoquée dans les documents consultés.

Dans les deux méthodes, les analytes cibles sont l'ETO et le 2-CE. Les limites de quantification (LOQ) sont de 0,01 mg/kg. L'incertitude de mesure étendue U est de 50 % au facteur k = 2 à 95 % d'intervalle de confiance.

3.5.1.2. Résultats

Le site 1 est celui où ont été identifiées des concentrations problématiques de 2-CE et où les teneurs les plus élevées ont été détectées. Environ 580 échantillons de gluten vital et 150 échantillons de gluten soluble ont été analysés, ainsi que quelques dizaines d'échantillons de co-produits (par exemple le son, le sirop de glucose). Des dizaines d'échantillons de matière première (blé) et de procédé ont également été analysés. Le blé, l'alcool mix et le sirop de glucose n'ont pas révélé la présence de 2-CE. En revanche, le gluten vital, certains échantillons de procédé et, dans une moindre mesure, des co-produits (gluten soluble et son) ont révélé des teneurs en 2-CE. Le plus ancien échantillon de gluten vital analysé a été prélevé le 14/02/2020 et présentait déjà du 2-CE (0,032 mg/kg) (Figure 2). La teneur en 2-CE a commencé à durablement dépasser les 0,10 mg/kg à partir du 22/10/2021 pour ne revenir en-dessous de cette valeur qu'après le 20/02/2022. Le 2-CE n'a plus été détecté depuis le 26/02/2022, après application des derniers changements du procédé de production.

¹⁷ <https://m.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/bs-en-iso-iec-170252018/exigences-generales-concernant-la-competence-des-laboratoires-detalonnages-/eu150585/228742>

¹⁸ Portée flexible = permet au laboratoire de modifier la méthodologie et d'autres paramètres (échantillon, analyse, etc) dans le cadre de la compétence reconnue.

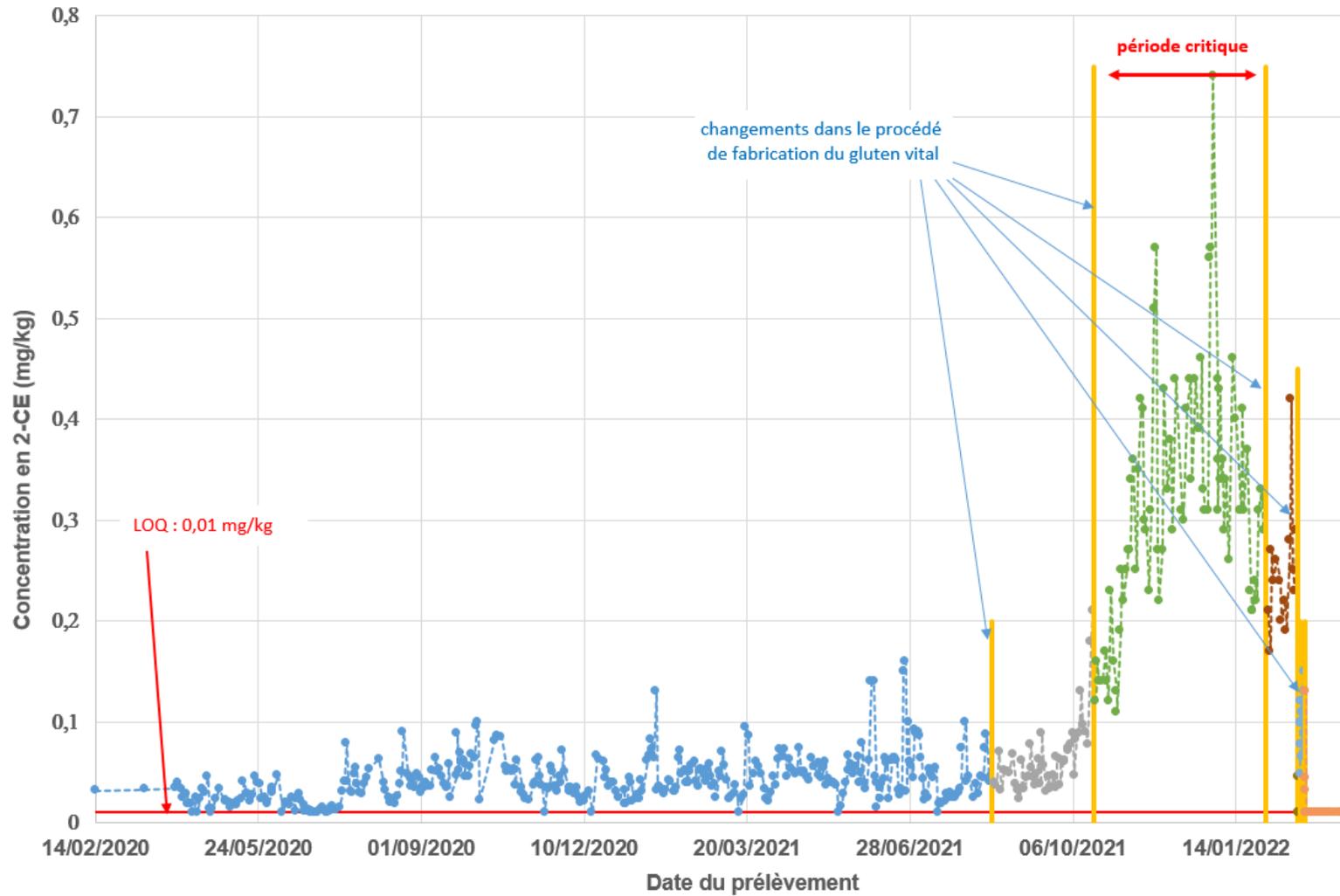


Figure 2 : Évolution de la teneur en 2-CE dans le gluten vital du site 1 au cours du temps (barres oranges verticales : changements opérés dans le procédé de fabrication du gluten vital).

Le site 2 a présenté des teneurs moindres mais néanmoins quantifiées en 2-CE. Un peu plus de 40 échantillons de gluten vital ont été analysés et quelques échantillons d'autres types. Seul le gluten vital s'est révélé contenir du 2-CE. Le plus ancien échantillon de gluten vital analysé a été prélevé le 18/02/2019 et présentait déjà du 2-CE (0,081 mg/kg). La teneur en 2-CE n'a jamais durablement dépassé les 0,10 mg/kg. A partir du 18/02/2022, la disparition du 2-CE dans le gluten vital a été atteinte à la faveur de l'application des derniers changements dans le procédé de production.

A partir de l'ensemble des résultats analytiques issus des deux sites, le GECU 2-CE a estimé utile de distinguer deux types de niveau de contamination du gluten vital observés au cours du temps et consécutifs aux changements intervenus dans le procédé de production.

1. Un niveau de contamination dite « basale »

La période de temps correspondant à la contamination « basale » du gluten vital en 2-CE dans les échantillons issus du site 1 est couverte par 427 échantillons (du 14/02/2020 au 18/10/2021) et par 20 échantillons (du 18/02/2019 au 01/02/2022) pour le site 2. Considérant une approche de type « upper-bound » (à la LOQ de 0,01 mg/kg) la moyenne associée à une contamination basale est de 0,044 mg/kg ($\pm 57\%$) pour le site 1 et de 0,057 mg/kg ($\pm 59\%$) pour le site 2. Considérant l'incertitude, un niveau de contamination « basale » moyen arrondi à 0,06 mg/kg est retenu.

2. Un niveau de contamination dite « critique »

La période critique entre deux changements de procédé de production (entre le 19/10/21 et le 01/02/22) correspond aux plus fortes valeurs de contamination en 2-CE. Cette période est couverte par 77 échantillons, dont celui à l'origine de la réclamation client et un autre présentant la valeur maximale en 2-CE (0,474 mg/kg). Il est convenu au sein du GECU 2-CE qu'il est plus robuste de considérer la moyenne de ces échantillons plutôt qu'une seule mesure pour représenter un niveau de contamination du gluten vital en situation d'incident. En effet, considérant l'incertitude de mesure analytique ($\pm 50\%$), le GECU 2-CE a considéré préférable de travailler avec un nombre représentatif d'échantillons. Après avoir écarté les premières mesures (jusqu'au 04/11/2021) correspondant à un état transitoire vers une phase stabilisée de la contamination, un niveau de contamination « critique » moyen (calculé à partir des 65 mesures restantes) de 0,35 mg/kg ($\pm 29\%$) est retenu.

3.5.2. Étude INCA3 (2014-2015) : Données sur les consommations alimentaires détaillées et sur les recettes décomposées en ingrédients

La 3^{ème} étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA3) est une enquête transversale coordonnée par l'Anses visant à estimer les consommations alimentaires et les comportements en matière d'alimentation des individus vivant en France (ANSES, 2017b). L'étude a été menée entre février 2014 et septembre 2015 auprès d'un échantillon représentatif d'individus vivant en France métropolitaine (hors Corse).

Les individus ont été sélectionnés selon un plan de sondage aléatoire à trois degrés (unités géographiques, logements puis individus), à partir du recensement annuel de la population de 2011, en respectant une stratification géographique (région, taille d'agglomération) afin d'assurer la représentativité sur l'ensemble du territoire. Deux échantillons indépendants ont été constitués : un échantillon « Enfants » (0-17 ans) et un échantillon « Adultes » (18-79 ans).

Les données recueillies dans l'étude portent sur diverses thématiques en lien avec l'évaluation des risques nutritionnels ou sanitaires liés à l'alimentation : consommations d'aliments, de boissons et de compléments alimentaires, habitudes alimentaires, pratiques potentiellement à risque au niveau sanitaire, connaissances et comportements en matière d'alimentation.

Afin d'assurer la représentativité nationale des résultats présentés, les individus participants ont fait l'objet d'un redressement. Ce redressement a été réalisé séparément chez les enfants et chez les adultes en tenant compte de variables géographiques et socio-économiques.

3.5.2.1. Méthode de recueil des consommations alimentaires

Les consommations alimentaires des individus ont été recueillies sur 3 jours non consécutifs (2 jours de semaine et 1 jour de week-end) répartis sur environ 3 semaines, par la méthode des rappels de 24 heures (R24) pour les individus âgés de 15 à 79 ans et par la méthode des enregistrements de 24 (*via* un carnet alimentaire) pour les individus âgés de 0 à 14 ans. Pour les 3 jours sélectionnés, les individus devaient décrire leurs consommations alimentaires en identifiant tous les aliments et boissons consommés dans la journée et la nuit précédentes. Ils devaient les décrire de façon aussi détaillée que possible et les quantifier à l'aide notamment d'un cahier de photographies de portions alimentaires et de mesures ménagères. Quel que soit l'âge, les interviews étaient conduites par téléphone, à l'aide d'un logiciel standardisé, par des enquêteurs professionnels spécifiquement formés aux méthodes mises en œuvre et à l'utilisation du logiciel.

Lors du recueil des consommations alimentaires, certains plats étaient considérés comme des recettes et une décomposition en ingrédients était proposée à l'individu, avec possibilité de modifier la nature et la quantité des ingrédients de la recette (ajout, substitution, suppression). Les autres aliments n'ont pas été détaillés en ingrédients au moment du recueil pour ne pas alourdir la charge de réponse à l'étude. Ces aliments ont donc été décomposés en ingrédients *a posteriori*.

3.5.2.2. Base de recettes décomposées en ingrédients

Parallèlement à l'étude INCA3, une base de recettes a été constituée. Cette base comprend :

1. les recettes standard proposées au moment du recueil ;
2. les aliments complexes *déclarés faits maison* les plus cités dans l'étude INCA3, décomposés à l'issue du recueil (ex : tarte aux pommes = pâte à tarte, crème pâtissière, pommes).

Pour ces derniers, la recette correspond à une recette générique moyenne résultant de la combinaison des 5 recettes les plus consultées sur internet. Le choix des ingrédients et leur quantification dans la recette générique a fait l'objet d'une méthodologie précise définie par l'Anses, afin de standardiser la décomposition des recettes et de s'assurer d'obtenir des recettes génériques représentatives de ce que pourraient être les recettes maison de ces aliments.

Ces recettes génériques fait-maison ont été affectées à tous les aliments complexes correspondants, quelle que soit l'origine déclarée (fait-maison, industrielle ou artisanale...), de façon à permettre l'identification des ingrédients d'intérêt dans l'ensemble de l'alimentation.

3.5.2.3. Effectif et données relatives aux individus

Au total, 5 855 individus, répartis en 2 698 enfants de la naissance à 17 ans et 3 157 adultes âgés de 18 à 79 ans, ont participé à l'étude. Parmi ces 5 855 individus, 4 114 (2 121 adultes

et 1 993 enfants) ont validé le volet consommation en répondant à au moins 2 interviews alimentaires. C'est sur cette base que sont établis les résultats d'exposition.

3.5.3. Identification des aliments contenant du gluten ajouté

D'après la liste des produits fournis par le pétitionnaire et suite aux recherches complémentaires menées par le GECU 2-CE, les aliments suivants ont été identifiés comme pouvant être concernés par l'adjonction du gluten vital :

- Pains et pain de mie ;
- Viennoiseries ;
- Pâtes alimentaires (spaghetti, ravioli, *etc.*) ;
- Produits composés à base de pains et viennoiseries (sandwich, *etc.*) ;
- Barres céréalières ;
- Substituts à la viande ;
- Biscuits feuilletés ;
- Biscuits hyperprotéinés ;
- Pâtes de types pâtes brisées, feuilletées, pizzas, *etc.*¹⁹ ;
- Produits composés à base de pâtes (pizzas, feuilletés, tartes, *etc.*).

Les aliments suivants ont été suggérés comme potentiellement concernés par l'adjonction du gluten vital : céréales pour le petit-déjeuner, crèmes desserts, glaces lactées, soupes et sauces. Cependant, les données disponibles à date n'ont pas permis de considérer ces aliments dans l'étude d'exposition (aucune donnée d'incorporation, certitude de la présence ou non du gluten ajouté). D'après les données disponibles fournies par la DGCCRF, le gluten vital n'est pas ajouté dans les farines infantiles. Ces produits n'ont donc pas été considérés dans cette expertise. Le gluten ajouté aux aliments destinés aux animaux n'a pas été considéré, compte tenu du fait que les produits concernés visaient uniquement des animaux domestiques.

3.5.4. Pourcentage de gluten vital incorporé

Les pourcentages maximaux de gluten incorporé dans les farines ou les produits consommés ont été définis à partir des données d'incorporation de gluten vital fournies par la DGCCRF. Pour connaître le pourcentage d'incorporation de farine dans les produits finis comme le pain, les pâtes et les viennoiseries, le pourcentage maximal de farine utilisé dans les recettes INCA3 a été considéré.

A noter, la majorité de plats composés de pain ou de pâtes ont été décomposés en ingrédients dans la base des recettes INCA3. Par exemple, un « sandwich jambon beurre » est décomposé en « pain blanc », « jambon blanc » et « beurre » avec leur quantité correspondante. Ainsi, les pâtes et les pains consommés dans un aliment composé (sandwich, hamburger, quiche, gratin de pâtes, *etc.*) sont considérés au même titre que les pains ou pâtes consommés seuls. Cependant, quelques aliments complexes à base de pain ou de pâtes n'ont pas été décomposés. Pour ces aliments, le pourcentage maximal de pain ou de pâtes identifié dans les recettes INCA3 a été utilisé.

Ces pourcentages sont résumés dans le Tableau 3. Les données des teneurs en gluten vital dans la farine sont issues des documents transmis par la DGCCRF, les données de

¹⁹ Dans une démarche maximaliste et en suivant la logique que les viennoiseries sont faites à base de pâte feuilletée, il a été considéré pertinent de maintenir la catégorie « pâtes à tarte, pizza... » dans le calcul des expositions

pourcentage de farine dans le produit fini sont issues de la base des recettes INCA3. La teneur en gluten vital dans le produit fini a été estimée par le GECU 2-CE.

Tableau 3 : Pourcentage d'incorporation du gluten vital dans les produits finis tels que consommés

Catégorie	Teneur en gluten vital dans la farine (%)	Pourcentage de farine (recettes INCA3)	Pourcentage de pain ou de pâtes (recettes INCA3)	Teneur en gluten vital estimée dans le produit fini (%)
Pains	8,0	84,8		6,79
Pains de mie	3,2	82,7		2,68
Viennoiseries	-(3)			2,0
Substituts de viande	-(3)			17,0
Pâtes alimentaires (spaghetti, etc.)	1,0	64,8		0,65
Pâtes (brisée, feuilletée, etc.)	1,0	81,7		0,82
Barres céréalières	-(3)			3,00
Biscuits feuilletés	-(3)			4,00
Biscuits hyperprotéinés	-(3)			16,0
Feuilletés	1,0	81,7 ⁽¹⁾	64	0,53
Galettes des rois	1,0	81,7 ⁽¹⁾	52	0,43
Tartes	1,0	81,7 ⁽¹⁾	62	0,50
Pizzas	1,0	81,7 ⁽¹⁾	42	0,34
Quiches	1,0	81,7 ⁽¹⁾	34	0,28
Tourtes	1,0	81,7 ⁽¹⁾	28	0,23
Hamburgers	8,0	84,8 ⁽²⁾	51	3,46
Wraps / Burritos	8,0	84,8 ⁽²⁾	41	2,78
Sandwichs	8,0	84,8 ⁽²⁾	69	4,70

⁽¹⁾ Pourcentage correspondant à l'aliment « pâtes » ; ⁽²⁾ Pourcentage correspondant à l'aliment « pains » ; ⁽³⁾ Non concerné

Dans le cadre d'une approche maximaliste, plusieurs hypothèses ont été émises :

- L'ensemble de la production française de gluten vital utilisé comme ingrédient alimentaire est concerné par une contamination au 2-CE ;
- Tous les types de pains (pain blanc, complet, tortilla, pains spéciaux, etc.) ont été considérés. Seuls les aliments avec la mention « sans gluten » ont été exclus ;
- Les aliments de types « saucisson brioché » et « croissant au jambon/fromage » ont été considérés comme contenant 100 % de viennoiserie ;
- Les pâtes alimentaires farcies (ravioli, etc.) ont été considérées comme contenant 100 % de pâtes ;
- Les pourcentages de farine dans les pâtes sont exprimés par rapport au poids sec ;
- Au sein de la nomenclature des aliments INCA3, il n'y a pas de précision sur la présence ou non de protéines de blé dans les barres céréalières. Ainsi, toutes les barres céréalières présentes dans l'étude INCA3 ont été considérées comme contenant du gluten vital ;
- Au sein de la nomenclature des aliments INCA3, il n'y a pas de précision sur la présence ou non de protéines de blé dans les biscuits diététiques. Ainsi, tous les biscuits diététiques présents dans l'étude INCA3 ont été considérés comme biscuits hyperprotéinés c'est à dire enrichis en protéines de blé ;

- Tous les substituts de viande ont été considérés comme enrichis en protéines de blé, même ceux à base de soja. Il s'agit des aliments suivants : « boulette végétale », « escalope végétale », « nugget végétal », « plat cuisiné à base de soja n.s. », « saucisse végétale », « haché végétal » et « steak de céréales ».

3.5.5. Calcul des expositions individuelles au 2-CE

Pour calculer les expositions, une teneur en 2-CE a été affectée à tous les aliments pouvant contenir du gluten vital selon les pourcentages établis dans le tableau 3. Seul le gluten vital ajouté intentionnellement (et non le gluten présent naturellement dans les céréales) a été considéré comme étant contaminé par du 2-CE.

Les calculs qui sont mis en œuvre ne tiennent pas compte de potentielles pertes par évaporation au cours des procédés et de la préparation culinaire, en particulier lorsqu'il y a chauffage à l'air libre. L'approche retenue sera donc protectrice du point de vue du consommateur.

Dans cette expertise, un seul scénario est considéré. Il s'agit d'un scénario maximisant, qui considère une exposition « subchronique » (environ 3 mois) des consommateurs, correspondant à la période la plus critique de contamination du gluten vital en 2-CE (à 0,35 mg/kg, cf chapitre 3.5.1.2). Cette exposition subchronique sera considérée au regard des 2 valeurs sanitaires établies par le GECU 2-CE (cf. chapitre 3.4.11).

Ainsi, à partir des teneurs en gluten vital estimées dans les produits finis (Tableau 3), les concentrations en 2-CE dans chacun de ces produits finis ont été calculées (Tableau 4).

Tableau 4 : Concentration en 2-CE (en mg/kg de produit fini) par type de produits finis

Catégorie	Concentration en 2-CE (en mg/kg de produit fini) dans le cadre d'une contamination du gluten vital de 0,35 mg/kg
Pains	0,020
Pains de mie	0,008
Viennoiseries	0,007
Substituts de viande	0,051
Pâtes alimentaires (spaghetti, etc.)	0,002
Pâtes (brisées, etc.)	0,002
Barres céréalières	0,009
Biscuits feuilletés	0,012
Biscuits hyperprotéinés	0,048
Feuilletés	0,002
Galettes des rois	0,001
Tartes	0,002
Pizzas	0,001
Quiches	0,001
Tourtes	0,001
Hamburgers	0,010
Wraps / Burritos	0,008
Sandwichs	0,014

Les expositions au 2-CE de la population française ont été calculées séparément pour différentes tranches d'âges : les jeunes enfants de 0 à 3 ans, les enfants de 4 à 17 ans et les adultes de 18 à 79 ans.

Les principaux aliments vecteurs ont été identifiés en utilisant la catégorisation présentée au chapitre 3.5.3. La contribution moyenne de chaque catégorie d'aliment à l'exposition totale a été estimée.

3.6. Estimation de l'exposition alimentaire au 2-CE de la population française générale

3.6.1. Distribution de l'exposition au 2-CE

Le Tableau 5 indique les moyennes et les distributions de l'exposition chez les trois populations définies.

Tableau 5 : Description de l'exposition alimentaire au 2-CE (en $\mu\text{g}/\text{kg p.c./jour}$) estimée à partir des données de consommation de l'étude INCA3 de la population générale française en fonction des classes d'âge définies

Classe d'âge	Effectif	Moyenne	Médiane	P75	P95
Adultes (18 à 79 ans)	2121	0,044 [0,042 - 0,047]	0,035	0,058	0,109
Jeunes enfants (0 à 3 ans)	218	0,038 [0,030 - 0,047]	0,024	0,053	0,141
Enfants (4 à 17 ans)	1775	0,053 [0,051 - 0,056]	0,042	0,069	0,134

En prenant en compte les aliments cités en 3.5.3, dans le cadre d'une contamination moyenne du gluten vital de 0,35 mg/kg, l'estimation de l'exposition journalière moyenne au 2-CE est de **0,044 $\mu\text{g}/\text{kg p.c./jour}$** chez les adultes, de **0,038 $\mu\text{g}/\text{kg p.c./jour}$** chez les jeunes enfants de 0 à 3 ans et de **0,053 $\mu\text{g}/\text{kg p.c./jour}$** chez les enfants de 4 à 17 ans.

Au sein de l'étude INCA3, il y a 29 actes de consommations de substituts de viande à base de soja et autres végétaux (considérés ici comme étant à base de protéines de blé) consommés par 25 individus différents (certains individus en consomment plusieurs au cours des rappels de 24h).

Au sein de l'étude INCA3, il y a 74 actes de consommations de biscuits hyperprotéinés (considérés ici comme étant enrichis en protéines de blé) consommés par 54 individus (certains individus en consomment plusieurs au cours des rappels de 24h).

3.6.2. Identification des aliments contribuant à l'exposition au 2-CE

Les principaux groupes d'aliments contribuant à l'exposition totale en 2-CE sont (Tableaux 6, 7 et 8) :

- Les pains à hauteur de 88,8 % chez les adultes, 76,7 % chez les jeunes enfants de 0 à 3 ans et 75,1 % chez les enfants de 4 à 17 ans ;
- Les pâtes alimentaires à hauteur de 8,8 % chez les jeunes enfants de 0 à 3 ans et 7,0 % chez les enfants de 4 à 17 ans ;
- Les viennoiseries à hauteur de 6,8 % chez les jeunes enfants de 0 à 3 ans et 9,2 % chez les enfants de 4 à 17 ans ;
- Les pains de mie à hauteur de 5,3 % chez les enfants de 4 à 17 ans.

Tableau 6 : Contribution des différents types d'aliments à l'exposition au 2-CE chez les adultes (18 à 79 ans) de l'étude INCA3

Catégories	Exposition moyenne (µg/kg p.c./jour)	Contribution (%)
Barres céréalières	0,0001	0,1
Biscuits hyperprotéinés	0,0002	0,4
Biscuits Feuilletés	0,0000	0,1
Pains	0,0394	88,8
Pains de mie	0,0007	1,7
Pâtes (brisées, etc.)	0,0000	0,0
Pâtes alimentaires (spaghetti, etc.)	0,0014	3,2
Substituts de viande	0,0003	0,7
Viennoiseries	0,0014	3,2
Exposition moyenne	0,044 ^[1]	

^[1] Les plats à base de pâtes (quiches, tartes, etc.) et de pain (sandwichs, hamburgers, etc.) non décomposés en ingrédients dans la base INCA3 ne sont pas présentés, la somme des contributions n'est donc pas égale à l'exposition moyenne et celle des pourcentages n'est pas égale à 100 % (c.f. 3.5.4).

Tableau 7 : Contribution des différents types d'aliments à l'exposition au 2-CE chez les jeunes enfants (0 à 3 ans) de l'étude INCA3

Catégories	Exposition moyenne (µg/kg p.c./jour)	Contribution (%)
Barres céréalières	0,0001	0,1
Biscuits hyperprotéinés	0,0003	0,8
Biscuits Feuilletés	0,0000	0,1
Pains	0,0294	76,7
Pains de mie	0,0019	4,8
Pâtes (brisées, etc.)	- *	- *
Pâtes alimentaires (spaghetti, etc.)	0,0034	8,8
Substituts de viande	- *	- *
Viennoiseries	0,0026	6,8
Exposition moyenne	0,038 ¹	

^[1] Les plats à base de pâtes (quiches, tartes, etc.) et de pain (sandwichs, hamburgers, etc.) non décomposés en ingrédients dans la base INCA3 ne sont pas présentés, la somme des contributions n'est donc pas égale à l'exposition moyenne et celle des pourcentages n'est pas égale à 100 % (c.f. 3.5.4) ; * pas consommés.

Tableau 8 : Contribution des différents types d'aliments à l'exposition au 2-CE chez les enfants (4 à 17 ans) de l'étude INCA3

Catégories	Exposition moyenne (µg/kg p.c./jour)	Contribution (%)
Barres céréalières	0,0002	0,3
Biscuits hyperprotéinés	0,0001	0,2
Biscuits Feuilletés	0,0002	0,3
Pains	0,0401	75,1
Pains de mie	0,0028	5,3
Pâtes (brisées, etc.)	0,0000	0,0
Pâtes alimentaires (spaghetti, etc.)	0,0037	7,0
Substituts de viande	0,0002	0,5
Viennoiseries	0,0002	9,2
Exposition moyenne	0,053 ^[1]	

^[1] Les plats à base de pâtes (quiches, tartes, etc.) et de pain (sandwichs, hamburgers, etc.) non décomposés en ingrédients dans la base INCA3 ne sont pas présentés, la somme des contributions n'est donc pas égale à l'exposition moyenne et celle des pourcentages n'est pas égale à 100 % (c.f. 3.5.4).

3.7. Caractérisation du risque

3.7.1. Au regard de la VTi subchronique de 44 µg/kg p.c./jour retenue dans l'hypothèse où le 2-CE ne serait pas génotoxique

De par la nature des aliments concernés, pratiquement 100 % des adultes et des enfants de 4 à 17 ans sont exposés au 2-CE mais aucun dépassement de la VTi subchronique retenue de 44 µg/kg p.c./jour n'est observé. Chez les jeunes enfants de 0 à 3 ans, le taux d'individus exposés est de 80 % mais aucun dépassement de la VTi n'est observé. Le Tableau 5 indique que le P95 d'exposition le plus élevé parmi les trois groupes de populations considérés est inférieur à 0,5 % de la VTi subchronique retenue.

Ces résultats ne mettent pas en évidence de risque dans l'hypothèse d'une absence de génotoxicité du 2-CE pour l'ensemble de la population exposée durant la période de contamination du gluten vital dite critique.

3.7.2. Au regard du PoD de 44 mg/kg p.c./jour retenu dans l'hypothèse où le 2-CE serait génotoxique

La BMDL de 44 mg/kg p.c./jour a été utilisée pour calculer les marges d'exposition (Tableau 9). Les résultats des marges d'exposition en moyenne et au P95 pour les trois groupes de population considérés sont supérieures (au moins d'un facteur 30 à 40) à la marge critique retenue par le GECU 2-CE de 10 000.

Ces résultats ne mettent pas en évidence de préoccupation sanitaire dans l'hypothèse d'une génotoxicité positive du 2-CE pour l'ensemble de la population exposée durant la période de contamination du gluten vital dite critique.

Tableau 9 : Estimation des marges d'exposition (MoE) au 2-CE pour les individus de l'étude INCA3

Classe d'âge	BMDL (mg/kg p.c./jour)	Exposition moyenne (mg/kg p.c./jour)	Exposition au P95 (mg/kg p.c./jour)	Marge d'exposition	
				Pour l'exposition moyenne	Pour l'exposition au P95
Adultes (18 - 79 ans)	44	0,000044	0,000109	1 000 000	403 670
Jeunes enfants (0 - 3 ans)		0,000038	0,000141	1 157 895	312 057
Enfants (4 - 17 ans)		0,000053	0,000134	830 189	328 358

3.8. Incertitudes

Il existe deux grands types d'incertitude : l'incertitude liée à la variabilité stochastique (hétérogénéité) et l'incertitude liée à une connaissance limitée (*i.e.* incomplète ou imparfaite) (Anses, 2017c). Le tableau 10 liste les sources d'incertitude identifiées pour chacun des paramètres entrant dans l'évaluation du risque, à savoir celles liées à l'estimation de l'exposition alimentaire au 2-CE ainsi que celles liées à l'identification du danger et à la caractérisation du danger :

- (i) Part du marché national du gluten vital susceptible d'être contaminé par le 2-CE et entrant en tant qu'ingrédient ajouté dans le produit fini ;

- (ii) Teneur en gluten vital incorporé dans le produit fini ;
- (iii) Consommation des aliments susceptibles de contenir du gluten vital ajouté ;
- (iv) Contamination des aliments susceptibles de contenir du gluten vital ajouté ;
- (v) Valeurs sanitaires de référence.

Pour chaque source d'incertitude identifiée, il est mentionné dans le tableau 10 si cette incertitude a été prise en compte dans le calcul de l'exposition ou pour l'établissement des valeurs sanitaires de référence ou non, et si oui, de quelle manière. Certaines sources d'incertitude ont été prises en compte en formulant différentes hypothèses, ce qui a permis de qualifier le niveau d'incertitude ou éventuellement l'impact (sous-estimation ou surestimation) de ces hypothèses sur les conclusions.

Tableau 10 : Sources d'incertitude et impact de l'incertitude sur les conclusions

Paramètre	Source d'incertitude	Niveau d'incertitude	Prise en compte	Impact sur la conclusion
Incertitudes liées à l'estimation de l'exposition alimentaire au 2-CE				
Consommation des aliments susceptibles de contenir du gluten ajouté	Incertitudes liées à la collecte des données de consommation alimentaire (biais de mémoire, etc.)	Faible	Non pris en compte	Inconnu
	Absence de donnée sur de potentiels autres usages de gluten ajouté dans d'autres aliments non pris en compte	Fort	Non pris en compte	Inconnu
	Absence de donnée sur le type de produits alimentaires spécifiques (substituts et biscuits hyperprotéinés)	Fort	Extrapolation aux catégories alimentaires de substituts de viande à base de soja et de biscuits diététiques	Surestimation de la consommation de ces aliments
	Teneur en gluten incorporé dans le produit fini. Variabilité importante inter et intra alimentaire	Faible	Teneur max de gluten appliquée par catégories alimentaires des produits finis visés	Surestimation de la teneur en gluten incorporée dans le produit fini
	Variabilité interindividuelle des forts consommateurs (apports usuels)	Faible	Non pris en compte	Surestimation des percentiles élevés (P95)
Contamination des aliments susceptibles de contenir du gluten ajouté	Stabilité du 2-CE au cours du procédé (stockage et étapes de transformation des denrées)	Inconnu	Application d'une hypothèse de non dégradation	Surestimation des teneurs en 2-CE des aliments consommés

	Absence du % de pénétration du gluten ajouté par l'entreprise concernée par rapport au % national de gluten tout producteur confondu	Fort	Production de gluten par l'entreprise concernée, supposée être de 100 % de la part de marché national	Surestimation du % total de produit fini contaminé
	Absence de pondération de la contamination du gluten au regard des sites de production et du tonnage distribué	Fort	Non prise en compte : Application de l'hypothèse d'une contamination générale de l'ensemble des sites de production	Surestimation de la contamination de l'ensemble de la production de gluten
	Absence de données de contamination sur les produits finis	Fort	Application d'une hypothèse conservatrice via la contamination de 100 % des produits finis visés	Surestimation de la contamination des produits finis
	Taux d'humidité des aliments secs (ex : pâtes)	Faible	Application d'une hypothèse conservatrice considérant 0 % d'humidité dans ces aliments	Surestimation de la contamination des produits finis
Incertitudes liées à l'identification des dangers et la caractérisation du danger				
Identification du danger	Incertitude liée à la réactivité du 2-CE avec les composants de la denrée	Inconnu	Hypothèse de non-réactivité	Inconnu
	Potentiel génotoxique : Incertitude sur le corpus des données disponibles	Forte	Deux approches (génotoxique et non-génotoxique) ont été prises en compte pour la caractérisation du risque	Sans conséquence
Caractérisation du danger	Choix de l'effet critique (non génotoxique)	Fort	Application d'un UFd de 10	Surestimation du danger
	NOAEL de l'étude clé	Inconnu	Etablissement d'une BMDL comme PoD	Meilleure maîtrise de l'incertitude
	Effet utilisé pour caractériser les possibles effets génotoxiques	Fort	Prise en considération de la plus faible dose ayant un effet observable	Surestimation du danger

De nombreuses sources d'incertitudes identifiées par le GECU 2-CE sont associées à plusieurs paramètres pris en compte dans le calcul d'exposition et dans la caractérisation du danger. La prise en compte de ces paramètres est considérée par le GECU 2-CE comme étant majoritairement protectrice conduisant ainsi à une surestimation du risque comparativement au niveau auquel la population française a vraisemblablement été exposée durant la période critique de contamination du gluten vital au-2-CE.

3.9. Conclusions du GECU 2-CE

Cette expertise collective en urgence a été initiée à la demande de la DGCCRF suite à une alerte de contamination en 2-chloroéthanol (2-CE) de lots de gluten vital produit par une entreprise en France. Ces lots de gluten ont été incorporés en tant qu'ingrédient lors de la fabrication de nombreuses denrées alimentaires.

Sur la base des informations et données transmises par la DGCCRF et de l'analyse critique de la littérature scientifique disponible quant à la toxicité du 2-CE, le GECU 2-CE a réalisé une évaluation du risque pour le consommateur lié à la présence de 2-CE dans du gluten incorporé dans les denrées alimentaires.

L'analyse des études de génotoxicité n'a pas permis au GECU 2-CE de conclure quant au potentiel génotoxique/mutagène du 2-CE.

En conséquence, le GECU 2-CE a décidé de suivre deux approches considérant ou non l'hypothèse d'une possible génotoxicité du 2-CE. Pour ce faire, une seule étude clé a été identifiée pour établir deux valeurs repères. Dans l'hypothèse où le 2-CE ne serait pas génotoxique, une VTi (Valeur toxicologique indicative) subchronique de 44 µg/kg p.c./jour a été établie. Dans l'hypothèse où le 2-CE serait génotoxique, une BMDL (Benchmark dose - lower confidence limit) de 44 mg/kg p.c./jour a été retenue, et une MoE (Marge d'exposition) de 10 000 a été considérée telle que classiquement appliquée dans le cas de substances génotoxiques.

Le GECU 2-CE souligne que ces deux valeurs repères ne sont valables que dans le contexte particulier de cette expertise en urgence.

L'exposition des consommateurs a été évaluée pour la population française (enfants et adultes) à partir des données de consommation INCA3 et d'une contamination moyenne « critique » du gluten vital en 2-CE de 0,35 mg/kg correspondant au niveau de contamination observée pendant la période critique intervenue dans le procédé de fabrication du gluten. L'expertise a permis d'identifier une liste de produits alimentaires pouvant être concernés par l'incorporation de ce gluten vital et une estimation des teneurs en 2-CE dans les produits finis a pu être calculée.

Concernant la première question, le GECU 2-CE conclut que les résultats de la caractérisation du risque pour l'ensemble de la population exposée durant la période dite « critique » de contamination du gluten vital ne mettent pas en évidence de risque ni de niveau de préoccupation sanitaire et ce respectivement que cela soit dans l'hypothèse d'une absence de génotoxicité du 2-CE ou d'une génotoxicité du 2-CE.

De nombreuses sources d'incertitudes identifiées par le GECU 2-CE sont associées à plusieurs paramètres pris en compte dans le calcul d'exposition et dans la caractérisation du danger. La prise en compte de ces paramètres est considérée par le GECU 2-CE comme étant majoritairement protectrice conduisant ainsi à une surestimation du risque comparativement

au niveau auquel la population française a vraisemblablement été exposée durant la période critique de contamination du gluten vital au-2-CE.

Concernant la seconde question, le GECU 2-CE conclut que le niveau moyen de contamination « critique » du gluten vital en 2-CE (0,35 mg/kg) utilisé dans les calculs d'exposition du consommateur pour une durée limitée, ne met pas en évidence de risque ou de préoccupation sanitaire. La quasi-totalité des aliments pris en compte pour ces calculs d'exposition, dont les contributeurs majoritaires, présentent des niveaux de contamination en 2-CE ne dépassant pas la teneur de 0,02 mg/kg mentionnée par la DGCCRF.

4. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du groupe d'expertise collective d'urgence mobilisé pour une évaluation du risque associé à la présence résiduelle de 2-chloroéthanol (2-CE).

L'Anses souligne en premier lieu que cette expertise a été menée en partant du principe, considéré comme acquis par l'autorité compétente, que la contamination en 2-CE ne provient pas d'un traitement à l'oxyde d'éthylène (ETO) des cultures à l'origine des produits. Rappelons que l'usage de l'ETO en tant que produit phytosanitaire est interdit en Europe. A cet égard, l'Agence recommande que l'origine de la présence de 2-CE soit investiguée plus avant, notamment par rapport aux auxiliaires technologiques utilisés. En fonction des résultats de ces investigations, les dossiers en support aux autorisations d'emplois de ces auxiliaires devraient être complétés en vue d'une nouvelle évaluation.

Afin de répondre aux questions posées de la saisine et dans un contexte d'urgence, le groupe d'expertise collective d'urgence a choisi de travailler selon deux scénarios : l'un dans lequel le 2-chloroéthanol serait non génotoxique, et l'autre dans lequel le 2-chloroéthanol serait génotoxique. Aucun de ces deux scénarios n'a mis en évidence de risque sanitaire pour la population française qui aurait été exposée au 2-chloroéthanol sur la base d'hypothèses fortement conservatrices, en cohérence avec les sources et niveaux d'incertitudes identifiés.

L'Agence rappelle que les repères toxicologiques (VTi, BMDL et MOE)²⁰ appliqués dans cette évaluation n'ont pas vocation à être considérés dans tout autre contexte d'exposition au 2-chloroéthanol. En particulier, ils ne pourraient pas être utilisés pour justifier par une évaluation de risque une présence de 2-CE résultant d'un traitement à l'ETO.

L'Anses souligne enfin la nécessité de conduire des essais de génotoxicité répondant aux lignes directrices de l'OCDE²¹ afin de déterminer plus clairement le potentiel génotoxique du 2-chloroéthanol, en accord avec les recommandations de l'Efsa (EFSA, 2022).

Dr Roger Genet

²⁰ VTi= valeur toxicologique indicative, MOE= marge d'exposition, BMDL = Benchmark dose - lower confidence limit

²¹ Organisation de coopération et de développement économiques

MOTS-CLÉS

2-chloroéthanol, éthylène chlorohydrine, CAS 107-07-3, contamination, gluten vital.

2-chloroethanol, ethylene chlorhydrin, CAS 107-07-3, contamination, vital gluten

BIBLIOGRAPHIE

- Allavena A, Martelli A, Robbiano L, Brambilla G. (1992). Evaluation in a battery of in vivo assays of four in vitro genotoxins proved to be noncarcinogens in rodents. *Teratog Carcinog Mutagen.* 12:31-41.
- Amacher, D.; Turner, G. (1982) Mutagenic evaluation of carcinogens and non-carcinogens in the L5178YfrK assay utilizing postmitochondrial fractions (S9) from normal rat liver. *Mutat. Res.* 97:49-65.
- Ambrose, AM. (1950). Toxicological studies of compounds investigated for use as inhibitors of biological processes. II. Toxicity of ethylene chlorhydrin. *Arch Environ Occup Health* 2(5):591–597. 017887
- Andrews AW, Zawistowski ES and Valentine CR. (1976). A comparison of the mutagenic properties of vinyl chloride and methyl chloride., *Mutation Research* 40: 273-275.
- ANSES, 2017a : Valeurs toxicologiques de reference - Guide d'élaboration de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Juin 2017
- ANSES, 2017b : Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3). Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective. Juin 2017
- ANSES, 2017c : Illustrations et actualisation des recommandations pour l'évaluation du poids des preuves et l'analyse d'incertitude à l'Anses. Rapport d'expertise collective. Juin 2017
- Barber ED, Donish WH, Mueller KR. (1981). A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames Salmonella/microsome assay., *Mutation Research* 90: 31-48.
- BASF AG (1973). Abt. Toxikologie, unveroeffentlichte|Untersuchungen, (XXII/378). Rapport non-disponible.
- Benson LO, Teta MJ. (1993). Mortality due to pancreatic and lymphopietic cancers in chlorohydrin production workers. *Br J Ind Med* 50(8):710–716. 200224
- Bhat HK, Asimakis GK, Ansari GAS. (1991). Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by chloroethanols. *Toxicol Lett* 59 (1-3):203–211. 069116
- Bignami M, Conti G, Conti L, Crebelli R, Misuraca F, Puglia A, Randazzo R, Sciandrello G, Carere A. (1980a). Mutagenicity of halogenated aliphatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces coelicolor* and *Aspergillus nidulans*. *Chern. Biol. Interact.* 30:9-23.
- Bignami M, Crebelli R, Conti G, Conti L, Misuraca F, Puglia A, Randazzo R, Sciandrello G, Carere A. (1980b). In vitro mutagenicity studies with halogenated aliphatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 200:73-74.
- Blair AH, Vallee BL. (1966). Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 5(6):2026–2034. 031121
- Bonitenko I, Bocharov NV, Lishenko VV. (1981). Effect of ethyl alcohol on ethylene chlorohydrin toxicity indices. *Gig Tri Prof Zabol* 9:44–45. 624917

- Brusick D, Aardema M, Kier L, Kirkland D, Williams G. (2016). Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. *Critical Reviews in Toxicology* 46: 56-74.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2021). Updated BfR opinion on Health risk assessment of ethylene oxide residues in sesame seeds, Opinion no 024/2021, pp. 9.
- Carpenter CP, Smyth HFJr, Pozzani UC. (1949). The assay of acute vapor toxicity, and the grading and interpretation of results on 96 chemical compounds. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology* 31(6): 343-346
- Chen Y-T, Hsu C-I, Hung D-Z, Matsuura I, Liao J-W (2011). Effects of chloroacetaldehyde in 2-chloroethanol-induced cardiotoxicity. *Food Chem Toxicol* 49(5):1063–1067. 782805
- Chen, Y-T, Liao J-W, Hung D-Z. (2010). Protective effects of fomepizole on 2-chloroethanol toxicity. *Hum Exp Toxicol*. 29(6):507–512
- Conan L, Foucault B, Siou G, Chaigneau M, Le Moan G. (1979). Contribution à la recherche d'une action mutagène des résidus d'oxyde d'éthylène, d'éthylène glycol et de chloro-2-ethanol dans le matériel plastique stérilisé par l'oxyde d'éthylène. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 773:141-151.
- Courtney KD, Andrews JE, Grady M. (1982). Teratogenic evaluation of ethylene chlorhydrin (ECh, 2-chlorethanol) in mice. *J Environ Sci Health B* 17(4):381–391. 624948
- DeMarini DM, Brooks HG. (1992). Induction of prophage lambda by chlorinated organics: detection of some single-species/single-site carcinogens. *Environ Mol Mutagen* 19: 98-111.
- Deng J-F, Yang C-C, Tsai W-J, Ger J, Wu M-L. (2001). Acute ethylene chlorhydrin poisoning: Experience of a poison control center. *J Toxicol Clin Toxicol* 39(6):587–593. 624953
- Dunkelberg H. (1983). Carcinogenic activity of ethylene oxide and its reaction products 2-chlorethanol, 2-bromoethanol, ethylene glycol and diethylene glycol. II. Testing of 2-chlorethanol and 2-bromoethanol for carcinogenic activity. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene*, 01 Apr 1983, 177(3-4):269-281
- ECHA (2022). Dossier d'enregistrement REACH di 2-chloroéthanol. <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/13574/7/7/1>. Consulté le 06/04/2022
- ECHA. (2019). European Chemicals Agency - 2-chloroethanol - EC number: 203-459-7 | CAS number: 107-07-3 Last modified: 12-April-2019
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. *EFSA Journal* (2005) 282, 1-31 doi.org/10.2903/j.efsa.2005.282
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC). *EFSA Journal* 2012;10(7):2750. doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2750
- EFSA. (2016). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal* 2017;15(1):4658. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4658
- EFSA. (2019). Guidance on the use of the Threshold of Toxicological Concern approach in food safety assessment. *EFSA Journal* 2019;17(6):5708. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5708
- EFSA. (2022). Statement on the BfR opinion regarding the toxicity of 2-chloroethanol. *EFSA Journal* 2022;20(2):7147, 11 pp.
- Elmore J, Wong J, Laumbach A, Streips U. (1976). Vinyl chloride mutagenicity via the metabolites chlorooxirane and chloroacetaldehyde monomer hydrate. *Biochim. Biophys. Acta* 442: 405-419.
- Epstein S, Arnold E, Andrea J, Bass W, Bishop Y. (1972). Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23: 288-325.

- Ericsson RJ, Youngdale G.A. (1970). Male antifertility compounds: structure and activity relationships of U-5897, U-15,646 and related substances. *J. Reprod. Fert.*, 21, 263-266
- Eriksson L, Hellberg S, Johansson E, Jonsson J, Sjoström M, Wold S, Berglind R and Karlsson B. (1991). A strategy for ranking environmentally occurring chemicals. Part VI. QSARs for the mutagenic effects of halogenated aliphatics., *Acta Chemica Scandinavica* 45: 935-944.
- EURL-SRM, 2020. Analysis of ethylene oxide and its metabolite 2-chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS method and GC-MS/MS. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides - Analytical Observations Report. Version 1.1, December 2020.
- Friedman L, Scalera J, Keys JE, Peters EL, Gaines DW, Stone CL, Kasza L, Balazs T. (1992). Some biochemical and histological effects of 2-chloroethanol in rats. *Int J Toxicol* 1(3):37-56. 624977
- Goldblatt MW, Chiesman WE. (1944). Toxic effects of ethylene chlorohydrin. Part 1. Clinical. *Br J Ind Med* 1:207-213. 624985
- Greenberg HL, Ott MG, Shore RE. (1990). Men assigned to ethylene oxide production or other ethylene oxide related chemical manufacturing: A mortality study. *Br J Ind Med* 47(4):221-230. 625592
- Grunow W, Altmann HJ. (1982). Toxicokinetics of chloroethanol in the rat after single oral administration. *Arch Toxicol* 49(3-4):275-284. 624989
- Hall J, Safibill R, Green T, Hathway D. (1981). The induction of errors during in vitro DNA synthesis following chloroacetaldehydetreatment of poly(dA-dT) and poly(dC-dG) templates. *Carcinogenesis (London)* 2: 141-146.
- Haworth S, Lawlor, T, Mortelmans K, Spezck W, Zeiger E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ Mutagen* 5(1) doi.org/10.1002/em.2860050703
- Hendriks G, Atallah M, Morolli B, Calleja F, Ras-Verloop N, Huijskens I, Raamsman M, van de Water B and Vrieling H. (2012). The ToxTracker assay: novel GFP reporter systems that provide mechanistic insight into the genotoxic properties of chemicals. *Toxicological Sciences* 125: 285-298
- Hendriks G, Derr RS, Misovic B, Morolli B, Calleja, F M G R, and Vrieling, H. (2016). The extended ToxTracker Assay discriminates between induction of DNA damage, oxidative stress, and protein misfolding. *Toxicol. Sci.* 150: 190-203.
- Homburger F. (1968). Final report contract PH-43-67-677, project C-173. National Technical Information Service. Springfield, VA. 626400
- Huberman E, Bartsch H, Sachs L. (1975). Mutation induction in Chinese hamster V79 cells by two vinyl chloride metabolites, chloroethylene oxide and 2-chloroacetaldehyde. *Int. J. Cancer* 16: 639-644.
- Hung D, Chen Y, Hsu C. (2006). The role of 4-methylpyrazole as the antidote for 2-chloroethanol intoxication. *Toxicologist* 90:249. 625006
- Isakova G, Ekshtat B, Kerkis Y. (1971). On studies of the mutagenic properties of chemical substances in the establishment of hygienic standards. *Hyg. Sanit. (USSR)* 36:178-184. Translated from *Gig. Sanit.* 36:9-13, 1971.
- Ivett J L, Brown B M, Rodgers C, Anderson B E, Resnick M A, Zeiger E. (1989). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 14:165-187.
- Johnson M. (1967). Metabolism of chloroethanol in the rat. *Biochem Pharmacol* 16:185-199.
- Kitchin KT, Brown JL, Kulkarn AP. (1992). Predictive assay for rodent carcinogenicity using in vivo biochemical parameters: operational characteristics and complementarity. *Mutat Res* 266: 253-272.

- Knaap A, Voogd C, Kramers P (1982). Comparison of the mutagenic potency of 2chloroethanol, 2-bromoethanol, 1,2-epoxybutane, epichlorohydrin and glycidaldehyde in *Klebsiella pneumoniae*, *Drosophila melanogaster* and L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 101:199-208.
- LaBorde JB, Kimmel CA, Jones-Price C *et al.* (1982). Teratogenic evaluation of ethylene chlorohydrin in mice and rabbits. *Toxicologist*, 2, 71 (citée par l'ECHA)
- Laumbach A, Lee S, Wong J, Streips U. (1977). Studies on the Mutagenicity of Vinyl Chloride Metabolites and Related Chemicals. *Proceedings of the Third International Symposium on Detection and Prevention of Cancer* 1: 155-170.
- Lawrence WH, Itoh K, Turner JE, Autian J. (1971). Toxicity of ethylene chlorohydrins. II: Subacute toxicity and special tests. *J Pharm Sci* 60(8):1163–1168. 625007
- Liao JW, Hsu CI, Matsuura I, Chen YT. (2011). Chloroacetaldehyde induces chromosome aberrations and micronucleus formation but not 2-chloroethanol. *J Health Sci* 57 :300-303.
- Löfroth G. The mutagenicity of dichloroacetaldehyde. (1978). *Zeitschrift für Naturforschung C.* 33c:783-785 doi.org/10.1515/znc-1978-9-1031
- Loprieno N, Barale R, Baroncelli S, Bartsch H, Bronzetti G, Camellini A, Corsi C, Frezza D, Nieri R, Leporini C, Rosellini D, Rossi A. (1977). Induction of gene mutations and gene conversions by vinyl chloride metabolites in yeast. *Cancer Res.* 36: 253-257.
- Magkoufopoulou C., Claessen S.M.H., Tsamou M., Jennen D.G.J., Kleinjans J.C.S., van Delft J.H.M. (2012). A transcriptomics-based in vitro assay for predicting chemical genotoxicity in vivo. *Carcinogenesis* 33: 1421-1429.
- Malaveille C, Bartsch H, Barbin A, Camus AM, Montesano R, Croisy A, Jacquinson P. (1975). Mutagenicity of vinyl chloride, chloroethyleneoxide, chloroacetaldehyde and chloroethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 63 (2): 363-370
- Mamber SW, Bryson Vernon, Katz SE. (1983). The Escherichia coli WP2/WP100 rec assay for detection of potential chemical carcinogens. *Mut Res Lett* 119(2): 135-144 doi.org/10.1016/0165-7992(83)90121-5
- Maron DM, Ames BN. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res – Genet Toxicol Environ Mutagen* 113 (3-4): 173-215 doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9
- Mason MM, Cate, CC, Baker J. (1971). Toxicology and carcinogenesis of various chemicals used in the preparation of vaccines. *Clin Toxicol* 4(2):185–204. 625587
- McCann J, Simmon V, Streitwieser D, Ames BN. (1975). Mutagenicity of chloroacetaldehyde, a possible metabolic product of 1,2-dichloroethane (ethylene dichloride), chloroethanol; ethylene, chlorohydrins), vinyl chloride, and cyclophosphamide. *Proc Nat Acad Sci* 72: 3190-3193.
- Mitchell JB, Russo A. (1987). The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity *Br. J Cancer Suppl.* 8:96-104.
- Müller L, Kasper P. (2000). Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res.* 464: 19-34.
- Nakamura A, Tateno N, Kojima S, Kaniwa M-A, Kawamura T. (1979). The mutagenicity of halogenated alkanols and their phosphoric acid esters for *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res – Genet Toxicol* 66(4): 373-380 doi.org/10.1016/0165-1218(79)90048-X
- Norpoth K, Reisch A, Heinecke A. (1980). Biostatistics of Ames test data. Norpoth, K and Garner, R. Eds: *Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens*. New York: SpringerVerlag, pp. 312-322.

- NTP (National Toxicology Program). (1985). Toxicology and carcinogenesis studies of 2-chloroethanol (ethylene chlorohydrin) (CAS No. 107-07-3) in F344/N rats and Swiss CD-1 mice (dermal studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Research Triangle Park, NC: TR 275.
- NTP. (1983). National Toxicology Program Technical Report Series No. 275 - Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2-Chloroethanol (Ethylene Chlorohydrin) (Cas No. 107-07-3) In F344/N Rats and Swiss Cd-1 Mice (Dermal Studies), November 1983 – pp 1-196
- OECD. (2007). Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models, OECD, No. 69 .
- OECD. (2016). Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. doi.org/10.1787/9789264264861-en 9789264264861
- OECD. (2017). Overview of the Set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and Updates Performed in 2014-2015.
- Oesch F, Doerj G. (1982). Detection of N2,3-ethenoguanine in DNA after treatment with chloroacetaldehyde in vitro. *Carcinogenesis (London)* 3: 663-665.
- Olsen GW, Lacy SE, Bodner KM, Chau M, Arceneaux TG, Cartmill JB, Ramlow JM, Boswell JM (1997). Mortality from pancreatic and lymphopoietic cancer among workers in ethylene and propylene chlorohydrin production. *Occup Environ Med* 54 :592-598.
- Oser B L, Morgareidge K, Cox G E, Carson S. (1975). Short-term toxicity of ethylene chlorohydrin (ECH) in rats, dogs and monkeys. *Food Cosmet Toxicol.* 13:313-5.
- Painter R, Howard R. (1982). The HeLa DNA-synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mutat. Res.* 92: 427-437.
- Pfeiffer EH, Dunkelbereg. (1980). Mutagenicity of ethylene oxide and propylene oxide and of the glycols and halohydrins formed from them during the fumigation of foodstuffs. *Food Cosmet Toxicol* 18(2): 115-118 doi.org/10.1016/0015-6264(80)90062-0
- Rannug U, Beije B. (1979).The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium*. II. activation by the isolated perfused rat liver. *Chem Biol Interact* 24(3): 265-285 doi.org/10.1016/0009-2797(79)90077-2
- Rannug U, Gothe R, Wachtmeister A. (1976). The mutagenicity or chloroethylene oxide, chloroacetaldehyde, 2-chloroethanol and chloroacetic acid, conceivable metabolites of vinyl chloride. *Chem Biol Interact* 12: 251-263.
- Rosenkranz H, Wlodkowski T. (1974). Mutagenicity of ethylene chlorohydrin. A degradation product present in foodstuffs exposed to ethylene oxide. *J. Agr. Food Chern.* 22: 407-409.
- Rosenkranz S, Carr H, Rosenkranz H. (1974). 2-Haloethanols--Mutagenicity and reactivity with DNA. *Mutat. Res.* 26:367-370.
- Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi K, Lim Y, Yamazaki S, Umeda M, Tanaka N. (2010). A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res* 702(1):100–122. 786084.
- Sakai H, Tsukamoto T, Yamamoto M, Kobayashi K, Yuasad H, Imaie T, Yanaib T, Masegib T, Tatematsu M. (2002). Distinction of carcinogens from mutagens by induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity. *Cancer Letters* 188 33–38.
- Sauvant MP, Pépin D, Bohatier J, Grolière CA. (1995). Comparison of six bioassays for assessing in vitro acute toxicity and structure-activity relationships for vinyl chloride monomer, its main metabolites and derivatives. *Sci Total Environ* 172 (1) :79-92.
- Shelby MD, Erexson GL, Hook GJ, Tice RR. (1993). Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: Results with 49 chemicals. *Environ Mol Mutagen.* 21:160-79.

- Sheu C, Cain K, Gryder R, Generoso W. (1983). Heritable translocations test with ethylene chlorohydrin in male mice. *J. Am. Col. Toxicol.* 2: 221-223.
- Simmon VF. (1979). In vitro mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*., *Journal of the National Cancer Institute* 62: 893-899.
- Smith CJ, Perfetti TA. Tumor site concordance and genetic toxicology test correlations in NTP 2-year gavage, drinking water, dermal, and intraperitoneal injection studies. *Toxicology Research and Application*. January 2018. doi:10.1177/2397847317751147
- Soo C, O'Brien PJ. (1994). Chloroacetaldehyde-induced hepatocyte cytotoxicity: Mechanisms for cytoprotection. *Biochem Pharmacol* 48(5): 1025-1032 doi.org/10.1016/0006-2952(94)90374-3
- Stich H, San R, Lam P, Koropatnick D. (1976). The Detection of Naturally Occurring and Man-made Carcinogens and Mutagens by the DNA Repair Assay. Second Joint U.S./USSR Symposium on the Comprehensive Analysis of the Environment pp. 85-88.
- Stolzenberg SJ, Hine CH. (1980). Mutagenicity of 2- and 3-carbon halogenated compounds in the salmonella/mammalian-microsome test. *Environ Mutagen* 2(1): 59-66 doi.org/10.1002/em.2860020109
- Storer RD, Conolly RB. (1985). An investigation of the role of microsomal oxidative metabolism in the in vivo genotoxicity of 1,2-dichloroethane. *Toxicology and Applied Pharmacology* 77: 36-46.
- Sun Q, Liao Y, Wang T, Wang G, Zhao F, Jin Y. (2016). Alteration in mitochondrial function and glutamate metabolism affected by 2-chloroethanol in primary cultured astrocytes. *Toxicol In Vitro*. 2016 Dec;37:50-60.
- Tang H, Sun Q, Wang T, Liao Y, Wang G, Zhao F, Jin Y. (2019). Upregulation of CYP2E1 expression causes oxidative damage induced by 2-chloroethanol in primary cultured rat astrocytes. *Neurotoxicology*. 2019 Dec;75:233-244.
- US-EPA (2012). United States Environmental Protection Agency - Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for 2-Chloroethanol (CASRN 107-07-3) Superfund Health Risk Technical Support Center National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development EPA/690/R-12/007F Final 11-26-2012 pp 1-47
- Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D. Tomlinson, N.J., Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Fd Chem. Toxic.* Vol. 28, No. 7, pp. 469-482
- Voogd C, van der Vet P. (1969). Mutagenic action of ethylene halogenhydrins. *Experientia* 25: 85-86.
- Voogd C. (1973). Mutagenic action of epoxy compounds and several alcohols. *Mutat. Res.* 21: 52-53.
- Voogd, C.; Jacobs, J.; van der Stel, J. (1972) On the mutagenic action of dichlorvos. *Mutat. Res.* 16:413-418.
- Wahlberg JE, Boman A. (1978). 2-Chloroethanol – Percutaneous Toxicity of a Solvent. *Dermatologica* 156:299-302
- Wang T, Jin X, Liao Y, Sun Q, Luo C, Wang G, Zhao F, Jin Y. (2018). Association of NF- κ B and AP-1 with MMP-9 Overexpression in 2-Chloroethanol Exposed Rat Astrocytes. *Cells*. 2018 Aug 7;7(8):96.
- Weisbrod, D., Stephan, U., Fischer, G.W. (1980). Untersuchungen zur akuten oralen Toxizität homologer w-Chloralkohole und w-Chloralkylacetate. *Z. ges. Hyg.*, 26, H.1, 17-18

- Wills JW, Halkes-Wellstead E, Summers HD, Rees P, Johnson GE. (2021). Empirical comparison of genotoxic potency estimations: the in vitro DNA-damage ToxTracker endpoints versus the in vivo micronucleus assay. *Mutagenesis* 36(4): 311-320
- Xu J, Oda S, Yokoi T. (2018). Cell-based assay using glutathione-depleted HepaRG and HepG2 human liver cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicology in Vitro* 48: 286-301.
- Yamada F, Sumida K, Saito KJ. (2016). An improved model of predicting hepatocarcinogenic potential in rats by using gene expression data. *Appl Toxicol.* 36(2) :296-308.
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W. (1987). Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental Mutagenesis* 9: 1-109.
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. (1992). Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals., *Environmental and Molecular Mutagenesis* 19: 2-141.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis relatif à l'évaluation des risques liés à la présence de 2-chloroéthanol (2-CE) dans du gluten incorporé dans des denrées alimentaires (saisine 2022-SA-0059). Maisons-Alfort : Anses, 98 p.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

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

GROUPE D'EXPERTISE COLLECTIVE EN URGENCE

GECU « 2-chloroéthanol »

Président

M. Claude ATGIE - Professeur des universités - Compétences en toxicologie

Membres

M. Sébastien ANThERIEU – Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie

M. Ronan CARIOU – Agent de recherche HDR, Oniris - Compétences en chimie analytique

M. Jean-Charles LEBLANC – Chef d'unité au laboratoire de sécurité des aliments, ANSES, Compétences en exposition alimentaire

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie

M. Alain-Claude ROUDOT - Professeur des universités - Compétences en modélisation mathématique

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Fernando AGUILAR – Direction de l'Évaluation des Risques – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments

M. Julien JEAN – Direction de l'Évaluation des Risques - Unité d'évaluation des risques liés aux aliments

Contributions scientifiques

Mme Morgane CHAMPION - Direction de l'Évaluation des Risques - Unité Méthodologie et Etudes

Mme Carine DUBUISSON - Direction de l'Évaluation des Risques - Unité Méthodologie et Etudes

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

ANNEXE 2 : SARAH NEXUS PREDICTION REPORT



Sarah Nexus Report 2-chloroethanol

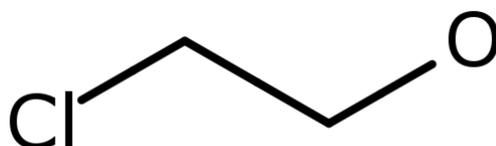
Report Information

Report Author	Report Created On	Prediction Created On	Program Version
	16 May 2022 16:42:35	16 May 2022 16:41:41	Sarah Nexus: 3.2.0
Endpoint	Model Name	Certified model	Model Version
Mutagenicity in vitro	Sarah Model - 2022.1	No	1.9

Prediction Settings

Reasoning Type	Equivocal Level	Sensitivity Level
Weighted	10%	10%

Submitted Compound



Structure name: 2-chloroethanol

Prediction

For the Mutagenicity in vitro endpoint with the Sarah Model - 2022.1 model, the compound is predicted to be Positive with 100% confidence in the prediction

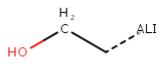
Hypotheses Summary

The compound is predicted to be positive with 100% confidence for the 'Mutagenicity in vitro' endpoint in the model: 'Sarah Model - 2022.1'. This is based on an exact match with a compound found in the training dataset. 3 supporting hypotheses were also found and are displayed for information.

Results	Number of Hypotheses
Positive	2
Negative	0
Positive (Overruled by Training Set Example)	1
Negative (Overruled by Training Set Example)	0
Total Count	3

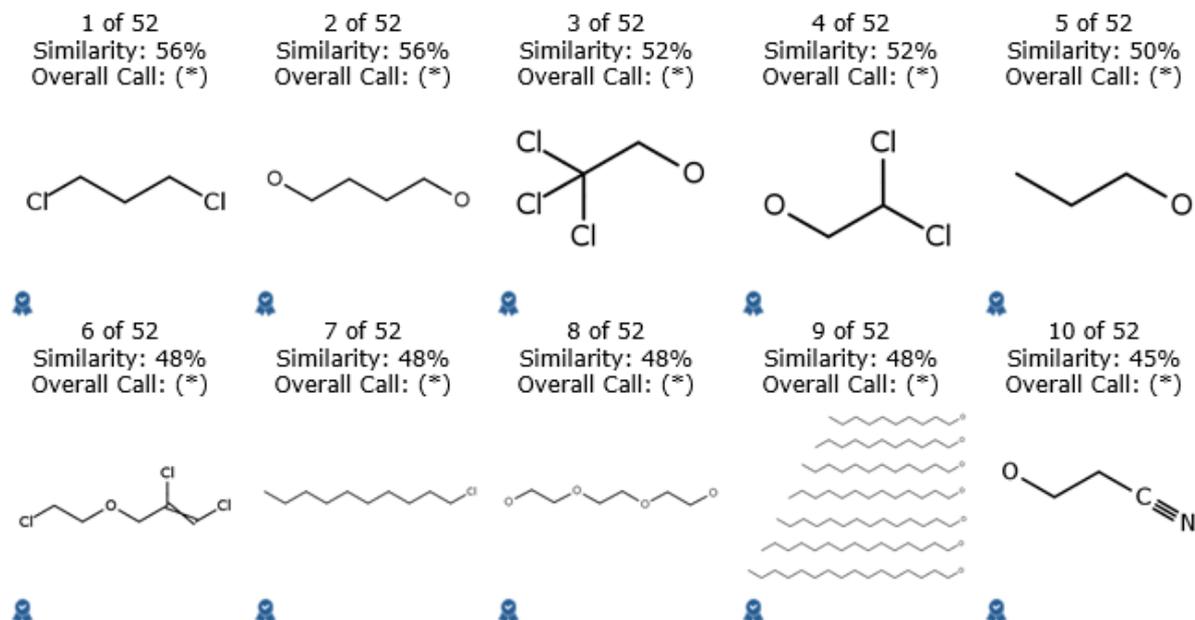
Hypothesis H-32	
Hypothesis (supported by exact match from training set)	
	
Sarah Result:	Positive
Confidence:	100%
589 examples	

Hypothesis H-209	
Hypothesis (supported by exact match from training set)	
	
Sarah Result:	Positive
Confidence:	100%
587 examples	

Hypothesis H-282	
Hypothesis (overruled by exact match from training set)	
	
Sarah Result:	Positive
Confidence:	100%
248 examples	

Additional Information

The compounds below are being shown for additional information. They were not used in the prediction but have a similarity to the query compound of 30% or higher.



* Rejected compounds have no result.

Glossary

Positive

The query structure is predicted to be positive in a bacterial reverse mutation assay (Ames test).

Negative

The query structure is predicted to be negative in a bacterial reverse mutation assay (Ames test).

Equivocal

A strong argument cannot be made based on the training set compounds and any hypotheses generated for the query compound for either activity or inactivity in a bacterial reverse mutation assay (Ames test). In the absence of a strong overall signal, an equivocal call has been made.

Out of Domain

At least one atom present in a fragment of the query compound is not represented by any of the fragments in the training set used to build the model. As a result, the compound is outside the training dataset domain and an overall prediction is not possible.

Confidence

The overall confidence for a prediction is determined from the confidence of the individual hypotheses activated by the structure. These are, in turn, based on the signal and the Tanimoto similarity of the nearest neighbours to the query structure used to build the hypothesis. In the absence of any hypotheses being activated by the query compound, the signal and Tanimoto similarity of the nearest neighbours from the entire training set are used to generate the overall confidence.

CAS Registry Numbers® (CAS RN®)

CAS Registry Numbers® are the intellectual property of the American Chemical Society; and are used by Lhasa Limited with the express permission of CAS. CAS Registry Numbers® have not been verified by CAS and may be inaccurate. Expert data scientists at Lhasa Limited cross reference CAS Registry Numbers® against multiple sources to achieve a high level of accuracy.

Copyright and Database Right Notice

© Copyright, Lhasa Limited, 2022. All rights reserved

The Sarah Nexus software, the content of reports generated by the use of that software, and the technical documentation relating to that software are proprietary to Lhasa Limited, and are protected by copyrights, database rights and similar intellectual property rights in jurisdictions all over the world.

The use of Lhasa Limited software, and the copying, distribution and other exploitation of the content of reports generated by the use of Lhasa Limited software and associated technical documentation, requires a licence from Lhasa.

Any unlicensed use of those assets will constitute an infringement of Lhasa's copyrights and/or database rights and/or other intellectual property rights in those assets.

Lhasa will take enforcement action in respect of any such intellectual property right infringements.

ANNEXE 3 : DEREK NEXUS PREDICTION REPORT



Derek Nexus Report

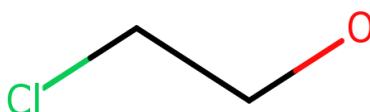
Report Information

Author	Report date	Prediction date	Program version
	16 May 2022 16:41:02	16 May 2022 16:38:30	Derek Nexus: 6.2.0, Nexus: 2.5.0

Processing Options

Selected Species bacterium, mammal	Selected Knowledge Base(s) Derek KB 2022 1.0	Reasoning Level At least EQUIVOCAL
Perceive tautomers Yes	Perceive mixtures Yes	Match alerts without rules No
Show Open likelihood No	Show Negative Predictions Yes	Show Rapid Prototypes Yes
Filter nearest neighbours on misclassified features Yes		

Submitted Compound - 2-chloroethanol



Smiles: ClCCO

Exact Mol Mass	80.0029
Average Mol Mass	80.51 (Source: Lhasa Limited, version 1.0)
Log Kp	-3.33 (Source: Potts & Guy, version 1.0)
Log P	-0.17 (Source: BioByte Corp., version 5.9)

Predictions

Knowledge Base: Derek KB 2022 1.0

Version 1.0	Last Modified Date 06/01/2022 11:16:05	Certified by Lhasa Limited, Leeds, Yorkshire, UK
-----------------------	--	---

Reasoning Summary

- Carcinogenicity in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 073 Alkylating agent
- Chromosome damage in vitro in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 027 Alkylating agent
- Hepatotoxicity in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 617 Halogenated hydrocarbon
- Mitochondrial dysfunction in mammal is EQUIVOCAL**
 - Alert matched: RapidPrototype110 Halogenated hydrocarbon
- Mutagenicity in vitro in bacterium is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 027 Alkylating agent
- Skin irritation/corrosion in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 922 Alkyl halide
- Skin sensitisation in mammal is NON-SENSITISER**
 - No misclassified or unclassified features

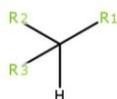
Endpoints not firing any alerts at the selected reasoning level (55)

5alpha-Reductase inhibition	Mutagenicity in vivo
Adrenal gland toxicity	Nephrotoxicity
alpha-2-mu-Globulin nephropathy	Neurotoxicity
Anaphylaxis	Non-specific genotoxicity in vitro
Androgen receptor modulation	Non-specific genotoxicity in vivo
Bladder disorders	Occupational asthma
Bladder urothelial hyperplasia	Ocular toxicity
Blood in urine	Oestrogen receptor modulation
Bone marrow toxicity	Oestrogenicity
Bradycardia	Peroxisome proliferation
Cardiotoxicity	Phospholipidosis
Cerebral oedema	Photo-induced chromosome damage
in vitro	
Chloracne	Photo-induced non-specific
genotoxicity in vitro	
Cholinesterase inhibition	Photo-induced non-specific
genotoxicity in vivo	
Chromosome damage in vivo	Photoallergenicity
Cumulative effect on white cell count and immunology	Photocarcinogenicity
Cyanide-type effects	Photomutagenicity in vitro
Developmental toxicity	Phototoxicity
Glucocorticoid receptor agonism	Pulmonary toxicity
HERG channel inhibition in vitro	Respiratory sensitisation
High acute toxicity	Skin sensitisation HPC
Irritation (of the eye)	Splenotoxicity
Irritation (of the gastrointestinal tract)	Teratogenicity
Irritation (of the respiratory tract)	Testicular toxicity
Kidney disorders	Thyroid toxicity
Kidney function-related toxicity	Uncoupler of oxidative
phosphorylation	
Lachrymation	Urolithiasis
Methaemoglobinaemia	

Alert Descriptions

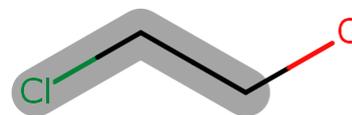
Alert: 027 Alkylating agent (from KB: Derek KB 2022 1.0)

Alert Description Image



R1 = Cl, Br, I, OS(=O)_nR4
 R2, R3 = any (with exclusions as specified in alert description)
 R4 = any except O, NH2, CF3
 n = 1, 2

Match with query compound



Comments

Chromosome damage (clastogenicity): in vitro chromosome aberration test

Mutagenicity: Ames test

This alert describes the genotoxicity of alkylating agents where the carbon bearing the functional group is a primary or secondary alkyl carbon atom. In addition to alkyl halides, it includes alkyl sulphinates, sulphonates and sulphates [Tan et al].

Alkyl halides are electrophilic species that are capable of directly alkylating DNA. Consequently, many compounds are mutagenic in the Ames test in the presence and absence of S9 mix, notably in *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA1535 [Barber et al, Eriksson et al]. In general, alkyl chlorides are less mutagenic than their bromo and iodo counterparts, and given the non-mutagenicity reported for n-butyl chloride [Barber et al, Zeiger et al 1987] and n-dodecyl chloride [Zeiger et al 1992], longer chain alkyl chlorides may not give a positive result in the Ames test [Barber et al]. Shorter chain alkyl chlorides such as methyl chloride [Andrews et al], ethyl chloride [Zeiger et al 1992] and 2-propyl chloride [Eriksson et al, Simmon et al] are, in contrast, known to be mutagenic.

There is evidence to suggest that the mutagenicity of some benzyl halides may not be observed in the Ames test [Ball et al]. This may be due, in part, to their high cytotoxicity and inability to be tested at high doses. The mutagenic activity of benzyl chloride has been shown to be dependent on exposure conditions, presumably on account of its volatility [Fall et al]. Using the standard Ames plate method, it is weakly mutagenic in TA100 only with S9 mix. However, strong activity is observed in the presence and absence of S9 mix when the test bacteria are exposed to vapours in a desiccator [Fall et al, Simmon]. Some secondary benzyl chlorides have demonstrated a lack of a mutagenic response, which has been attributed to the extra stability of the benzyl cation and formation of unstable DNA adducts which spontaneously cleave prior to replication [Ball and Young]. A number of benzyl chlorides with a halogen substituent elsewhere on the ring, including 4-chlorobenzyl chloride [Ball et al], 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride [ECHA 1996] and 1-[4-bromo-3-(chloromethyl)phenyl]-ethanone [ECHA 2014], have been reported as inactive in the Ames test. Corresponding biphenyl compounds, such as 4-(chloromethyl)biphenyl [Ashby et al 1981, Trueman and Callander], and polyaromatic compounds, such as 9-chloromethylantracene [Azuma et al] and 1-chloromethylpyrene [Ball and Young], have provided strong positive responses in the Ames test despite their toxicity. Heterocyclic analogues, such as 2-(chloromethyl)pyridine [Claxton et al], have also been reported to be mutagenic in the Ames test.

The following structural classes are excluded from the alert:

(1) Neopentyl compounds

Neopentyl compounds are excluded from the alert on the basis that such compounds are rarely mutagenic [Ashby et al 1984]. However, activity may be observed if the compound is a beta-halo carboxylic acid or its sulphinate, sulphonate or sulphate equivalent. This is based on the observed mutagenicity at pH 7.4 of 3-chloropivalic acid, which results from intramolecular cyclisation to a mutagenic beta-lactone.

(2) Primary alpha-halo ketones

Monochloropropanone [Merrick et al], chloroacetophenone [Zeiger et al 1987] and one compound donated by a Lhasa Limited member have all been reported non-mutagenic towards several *Salmonella typhimurium* strains in the Ames test despite being tested at low, non-cytotoxic, doses. Where activity is reported for this class of compounds, it is either observed in the presence of S9 mix, as highlighted by 2,2',4'-trichloroacetophenone [NTP 1993a], or gives a weak or equivocal response. Additionally, studies suggest that some phenacyl bromides may be oxidised by the DMSO solvent to afford mutagenic phenylglyoxals, which give rise to positive responses that are not observed when using acetone as the solvent [Azuma et al]. 1,3-Dichloroacetone has been reported mutagenic in the Ames test [Gold et al, Merrick et al] and bi-functional compounds of this type are not included in this restriction.

(3) Chloroacetamides

Chloroacetamides generally appear to be non-mutagenic in the Ames test based on four compounds donated by a Lhasa Limited member and supporting examples from the literature [Ashby et al 1985, Voogd et al]. Some benzyl-chloroacetamides have been reported mutagenic in the Ames test [Dolzani et al]. However, they often require the presence of S9 mix for mutagenic activity, indicating that mutagenicity arises through a mechanism other than direct alkylation. Phenyl-chloroacetamides are described elsewhere in the knowledge base.

(4) Beta-halo substituted alkyl halides

Alkyl halides with two or three halide substituents in the beta position, such as 1,1,2-trichloroethane [NTP 1984], 1,1,1,2-tetrachloroethane [NTP 1982a], 1,1,1,2-tetrabromoethane [NTP 1993b] and two compounds donated by a Lhasa Limited member, appear to be non-mutagenic towards several *Salmonella typhimurium* strains (including TA100 and TA1535) in the Ames test. However, it is important to note that cytotoxicity is observed for some of these compounds at relatively low doses without metabolic activation.

(5) Cyclic (3-6 membered carbocyclic ring) alkyl halides

Based on seven compounds donated by a Lhasa Limited member, cyclic alkyl halides generally appear to be non-mutagenic towards several *Salmonella typhimurium* strains (including TA100 and TA1535). As with the beta-halo substituted alkyl halides, cytotoxicity is observed with some of the compounds at relatively low doses without metabolic activation.

(6) Secondary bromoacetamides

N-Benzyl-2-bromo-2-phenylacetamide and N-phenyl-2-bromo-2-butylacetamide have been reported non-mutagenic in TA100 [Dolzani et al], with and without metabolic activation, which may be explained by the increased steric hindrance around the secondary carbon atom, thus making nucleophilic substitution more difficult at this position. However, mutagenic activity is observed when the compound is substituted at the secondary carbon with a small substituent as demonstrated by the activity of 2-bromopropionamide in TA100 [Dolzani et al]. Therefore, secondary bromoacetamides are excluded from the scope of this alert unless the substituent attached to the secondary carbon is a small group.

(7) Alkyl sulphinate, sulphonate or sulphate derivatives bearing an OH, NH₂ or CF₃ group directly bonded to the sulphur including common protonated/deprotonated forms

Compounds containing these functional groups appear to be non-mutagenic, based on limited public and proprietary data. Topiramate, methyl trifluoromethanesulfonate and one additional compound donated by a Lhasa Limited member are negative in the Ames test [Zeiger et al 1988, Seifried et al].

(8) Halogen-substituted benzyl chlorides

Based on 4-chlorobenzyl chloride [Ball et al], 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride [ECHA 1996], 1-[4-bromo-3-(chloromethyl)phenyl]-ethanone [ECHA 2014] and seven compounds donated by a Lhasa Limited member, benzyl chlorides with a halogen substituent on the benzene ring are generally non-mutagenic towards several *Salmonella typhimurium* strains (including TA100 and TA1535). This exclusion is not extended to other benzyl halides because the same inactivity is not observed across the chemical class, as demonstrated by a number of benzyl bromides, some of which are mutagenic and some non-mutagenic.

Positive results in the in vitro chromosome aberration test have been reported for several compounds, including 3-chloromethylpyridine hydrochloride [NTP 1982b], alpha-bromopropionic acid, methyl methanesulphonate and ethyl methanesulphonate [Sofuni].

Negative results have been reported for many alkyl halides in in vivo cytogenetic tests. For example, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,1,3-trichloropropene [Crebelli et al], 3-chloromethylpyridine hydrochloride [NTP 1993c] and 3-iodo-1,2-propanediol [NTP 1988] failed to induce micronuclei when tested in mouse bone marrow and administered intraperitoneally. Alkyl sulphates and sulphonates, on the other hand, have produced positive results in in vivo cytogenetic tests and this activity is covered elsewhere in the knowledge base.

This class of compound has often demonstrated mutagenicity in the in vivo transgenic rodent mutation assay. However, most activate other alerts and are thus described elsewhere in the knowledge base.

References

- Ashby J, Callander RD and Gilman D. (1984). Lack of mutagenicity to *S. typhimurium* of neopentyl bromide and pentaerythryl tetrachloride: relation to chemical structure., *Mutation Research*, 140 , 71-74, DOI: 10.1016/0165-7992(84)90045-9
- Tan EL, Brimer PA, Schenley RL and Hsie AW. (1983). Mutagenicity and cytotoxicity of dimethyl and monomethyl sulfates in the CHO/HGPRT system., *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 11 , 373-380, DOI: 10.1080/15287398309530351
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T and Mortelmans K. (1992). *Salmonella* mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 19 (supplement 21) , 2-141, DOI: 10.1002/em.2850190603
- Ashby J, Richardson CR, Lefevre PA, Callander RD and Styles JA. (1985). Chloracetamide-N-methanol: an example of an in vitro and in vivo clastogen which is non-mutagenic to *Salmonella*., *Mutation Research*, 156 , 19-32, DOI: 10.1016/0165-1218(85)90003-5
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K and Speck W. (1987). *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, 9 (supplement 9) , 1-109, DOI: 10.1002/em.2860090602
- Sofuni T (editor). (1999). Revised Edition 1998 Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro., *Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro*, , All pages
- Merrick BA, Smallwood CL, Meier JR, McKean DL, Kaylor WH and Condie LW. (1987). Chemical reactivity, cytotoxicity, and mutagenicity of chloropropanones., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 91 , 46-54, DOI: 10.1016/0041-008X(87)90192-X

- Simmon VF. (1979). In vitro mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*., *Journal of the National Cancer Institute*, 62 , 893-899, DOI: 10.1093/jnci/62.4.893
- Simmon VF, Kauhanen K and Tardiff RG. (1977). Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water., *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 2 , 249-258
- Andrews AW, Zawistowski ES and Valentine CR. (1976). A comparison of the mutagenic properties of vinyl chloride and methyl chloride., *Mutation Research*, 40 , 273-275, DOI: 10.1016/0165-1218(76)90054-9
- Trueman RW and Callander RD. (1982). 4-Chloromethylbiphenyl, 4-hydroxymethylbiphenyl and benzyl chloride: a comparison of mutagenic potential using the *Salmonella* reverse mutation assay., *Mutation Research*, 100 , 55-59, DOI: 10.1016/0165-1218(82)90021-0
- Voogd CE, Van der Stel JJ, Van Bruchem MC, Peters RJB and De Leer EWB. (1989) Research on the mutagenic activity of chlorinated products of cyanoethanoic acid in an aqueous environment (Dutch)., *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu Report*,
- Ashby J, Trueman RW, Styles J, Penman MG and Paton D. (1981) 4-Chloromethylbiphenyl (4CMB): a novel mutagen and potential carcinogen., *Carcinogenesis*, 2 , 33-38, DOI: 10.1093/carcin/2.1.33
- Azuma S, Kishino S, Katayama S, Akahori Y and Matsushita H. (1997). Mutagenicity of 12 HPLC labeling reagents for analyzing carboxyl compounds (Japanese)., *Kankyo Kagaku*, 7 , 249-255
- Ball JC, Foxall-VanAken S and Jensen TE. (1984). Mutagenicity studies of p-substituted benzyl derivatives in the Ames *Salmonella* plate-incorporation assay., *Mutation Research*, 138 , 145-151, DOI: 10.1016/0165-1218(84)90037-5
- Ball JC and Young WC. (1987). Mutagenicity studies of alpha, alpha'-dihalomethylbenzenes, alpha-methylbenzyl halides, and 1-chloromethylpyrene in the Ames assay., *Mutation Research*, 191 , 79-84, DOI: 10.1016/0165-7992(87)90133-3
- Barber ED, Donish WH and Mueller KR. (1981). A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames *Salmonella*/microsome assay., *Mutation Research*, 90 , 31-48, DOI: 10.1016/0165-1218(81)90048-3
- Claxton LD, Dearfield KL, Spanggord RJ, Riccio ES and Mortelmans K. (1987). Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome test., *Mutation Research*, 176 , 185-198, DOI: 10.1016/0027-5107(87)90049-2
- Dolzani L, Tamaro M, Monti-Bragadin C, Cavicchioni G, Vecchiati G and D'Angeli F. (1986). Selective mutagenic activity of 2-bromo-propanamides on *Salmonella typhimurium*: A structure-activity study., *Mutation Research*, 172 , 29-36, DOI: 10.1016/0165-1218(86)90102-3
- Eriksson L, Hellberg S, Johansson E, Jonsson J, Sjoström M, Wold S, Berglind R and Karlsson B. (1991). A strategy for ranking environmentally occurring chemicals. Part VI. QSARs for

- the mutagenic effects of halogenated aliphatics., *Acta Chemica Scandinavica*, 45 , 935-944, DOI: 10.3891/acta.chem.scand.45-0935
- Gold MD, Blum A and Ames BN. (1978). Another flame retardant, tris-(1,3-dichloro-2-propyl)-phosphate, and its expected metabolites are mutagens., *Science*, 200 , 785-787, DOI: 10.1126/science.347576
- National Toxicology Program (NTP). (1993). Salmonella study summary of 2,2',4'-trichloroacetophenone (CAS RN 4252-78-2)., *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1982). In vitro cytogenetics - chromosome aberrations of 3-chloromethylpyridine hydrochloride (CAS RN 6959-48-4)., *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1993). Salmonella study summary of 1,1,1,2-tetrabromoethane (CAS RN 630-16-0)., *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1982). Salmonella study summary of 1,1,1,2-tetrachloroethane (CAS RN 630-20-6)., *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1984). Salmonella study summary of 1,1,2-trichloroethane (CAS RN 79-00-5)., *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1993). Bone marrow micronucleus: study summary of 3-chloromethylpyridine hydrochloride (CAS RN 6959-48-4), *National Toxicology Program Web Server*
- National Toxicology Program (NTP). (1988). Bone marrow micronucleus: study summary of 3-iodo-1,2-propanediol (CAS RN 554-10-9)., *National Toxicology Program Web Server*
- Crebelli R, Carere A, Leopardi P, Conti L, Fassio F, Raiteri F, Barone D, Ciliutti P, Cinelli S and Vericat JA. (1999). Evaluation of 10 aliphatic halogenated hydrocarbons in the mouse bone marrow micronucleus test., *Mutagenesis*, 14, 207-215, DOI: 10.1093/mutage/14.2.207
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T and Mortelmans K. (1988). Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 11 (supplement 12), 1-158, DOI: 10.1002/em.2850110602
- Seifried HE, Seifried RM, Clarke JJ, Junghans TB and San RHC. (2006)
A compilation of two decades of mutagenicity test results with the Ames Salmonella typhimurium and L5178Y mouse lymphoma cell mutation assays, *Chemical Research in Toxicology*, 19 , 627-644, DOI: 10.1021/tx0503552
- Fall M, Haddouk H, Morin J-P and Forster R. (2007). Mutagenicity of benzyl chloride in the Salmonella/microsome mutagenesis assay depends on exposure conditions., *Mutation Research*, 633 , 13-20, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.04.017
- European Chemicals Agency (ECHA). (1996). Genetic toxicity: in vitro study for alpha,2-dichloro-6-fluorotoluene (CAS RN 55117-15-2)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*
- European Chemicals Agency (ECHA). (2014). Genetic toxicity: in vitro study for ethanone, 1-[4-bromo-3-(chloromethyl)phenyl]-ethanone (CAS RN 1844064-90-9)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*

Validation comments

Chromosome damage: in vitro chromosome aberration test

The alert has demonstrated the following predictive performance:

- 1) Sofuni data set: 22 compounds activate this alert of which 20 are reported positive (positive predictivity: 91%)
- 2) FDA CFSAAN data set: 86 compounds activate this alert of which 70 are reported positive (positive predictivity: 81%)

3) Kirkland data set: 29 compounds activate this alert of which 23 are reported positive (positive predictivity: 79%)

1) A collection of in vitro chromosome aberration test data for 712 compounds from the following source: Revised Edition 1998 Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro, Sofuni T (editor), Life-Science Information Center, Tokyo, 1999.

2) A collection of in vitro chromosome aberration test data for 2172 compounds derived from the FDA/CFSAN/OFAS knowledge base.

3) A collection of in vitro chromosome aberration test data for 488 compounds from the following reference: Kirkland D, Aardema M, Henderson L and Muller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. Mutation Research, 2005, 584, 1-256, available at "<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004>".

In assessing predictive performance, it should be noted that:

- Mammalian in vitro chromosome damage predictions in Derek associated with a reasoning level of equivocal or above have been considered positive;
- Predictions do not take into account (i) the tautomeric forms of compounds or (ii) the individual components of mixtures;
- The classification of compounds from the Sofuni data set as positive or negative is based upon an overall result which includes both polyploidy and structural chromosome aberration results;
- The classification of compounds from the FDA CFSAN data set as positive or negative is based upon a composite activity score for aberrations in vitro;
- Compounds in the data sets assigned responses other than positive or negative have been excluded from the analysis;
- No account has been taken of other chromosome damage alerts which may also be present in some compounds;
- No comparison has been made between the protocol used to obtain positive experimental results, including exposure time and metabolic activation, and the expected profile which may be included in the comments for an alert;
- Information from the data sets may have been used previously as supporting evidence for the derivation of some alerts;
- Some compounds may be present in more than one of the data sets analysed.

Chromosome damage: in vivo chromosome aberration test, in vivo micronucleus test

The alert has demonstrated the following predictive performance:

- 1) MMS data set: 0 compounds activate this alert
- 2) FDA CFSAN data set: 0 compounds activate this alert
- 3) FDA CFSAN data set: 0 compounds activate this alert

- 1) A collection of in vivo micronucleus test data for 256 compounds from the Kirkland (CGX) data set, collated by the Japanese Mammalian Mutagenesis Study Group (MMS).
- 2) A collection of in vivo chromosome aberration test data for 449 compounds derived from the FDA/CFSAN/OFAS knowledge base.
- 3) A collection of in vivo micronucleus test data for 1397 compounds derived from the FDA/CFSAN/OFAS knowledge base.

In assessing predictive performance, it should be noted that:

- Mammalian in vivo chromosome damage predictions in Derek associated with a reasoning level of equivocal or above have been considered positive;
- Predictions do not take into account (i) the tautomeric forms of compounds or (ii) the individual components of mixtures;
- The classification of compounds from the FDA CFSAN data set as positive or negative is based upon an activity score for aberrations in rodents;
- The classification of compounds from the FDA CFSAN data set as positive or negative is based upon a composite activity score for micronucleus in rodents;
- Compounds in the data sets assigned responses other than positive or negative have been excluded from the analysis;
 - No account has been taken of other chromosome damage alerts which may also be present in some compounds;
 - No comparison has been made between the protocol used to obtain positive experimental results, including exposure time, tissue examined or route of administration, and the expected profile which may be included in the comments for an alert;
 - Information from the data sets may have been used previously as supporting evidence for the derivation of some alerts.
- Some compounds may be present in more than one of the data sets analysed.

Mutagenicity: Ames test

The alert has demonstrated the following predictive performance:

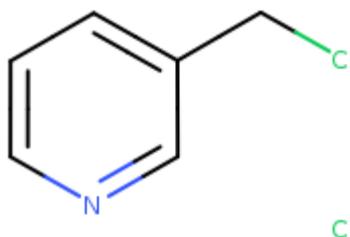
- 1) Proprietary data set 1: 178 compounds activate this alert of which 87 are reported positive (positive predictivity: 49%)
 - 2) Proprietary data set 2: 6 compounds activate this alert of which 3 are reported positive (positive predictivity: 50%)
 - 3) FDA CFSAN data set: 428 compounds activate this alert of which 339 are reported positive (positive predictivity: 79%)
- 1) A proprietary collection of Ames test data for 1812 chemicals.
 - 2) A proprietary collection of Ames test data for 475 chemicals contributed by Bayer Schering Pharma AG.
 - 3) A collection of Ames test data for 8421 compounds derived from the FDA/CFSAN/OFAS knowledge base.

In assessing predictive performance, it should be noted that:

- Bacterial mutagenicity predictions in Derek associated with a reasoning level of equivocal or above have been considered positive;
- Predictions do not take into account (i) the tautomeric forms of compounds or (ii) the individual components of mixtures;
- The classification of compounds from the FDA CFSAN data set as positive or negative is based upon composite activity scores for Salmonella and E.coli. Positive results in either Salmonella or E.coli leads to an overall active call;
- Compounds in the data sets assigned responses other than positive or negative have been excluded from the analysis;
- No account has been taken of other mutagenicity alerts which may also be present in some compounds;
- No comparison has been made between the strain and S9 dependency of positive experimental results and the expected profile which may be included in the comments for an alert;
- Information from the data sets may have been used previously as supporting evidence for the derivation of some alerts;
- Some compounds may be present in more than one of the data sets analysed.

 Examples for Alert 027 Alkylating agent

Example 1: 3-(chloromethyl) pyridine hydrochloride



CAS Registry Number®: 6959-48-4

Test Data (3-(chloromethyl) pyridine hydrochloride)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	Salmonella typhimurium	Ames test	Mutagenicity in vitro	positive

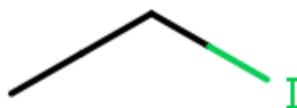
References: Claxton LD, Dearfield KL, Spanggord RJ, Riccio ES and Mortelmans K. (1987) Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the Salmonella typhimurium/mammalian microsome test., *Mutation Research*, 176 , 185-198
DOI: 10.1016/0027-5107(87)90049-2

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	hamster	in vitro chromosome aberration test	Chromosome damage in vitro	positive

References

- National Toxicology Program (NTP). (1982). In vitro cytogenetics - chromosome aberrations of 3-chloromethylpyridine hydrochloride (CAS RN 6959-48-4)., *National Toxicology Program Web Server*

Example 2: iodoethane



CAS Registry Number®: 75-03-6

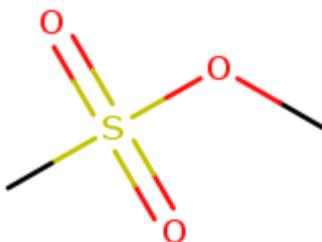
Test Data (iodoethane)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	Salmonella typhimurium	Ames test	Mutagenicity in vitro	positive

References: Barber ED, Donish WH and Mueller KR. (1981)

A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames Salmonella/microsome assay., *Mutation Research*, 90 , 31-48, DOI: 10.1016/0165-1218(81)90048-3

Example 3: methyl methanesulphonate



CAS Registry Number®: 66-27-3

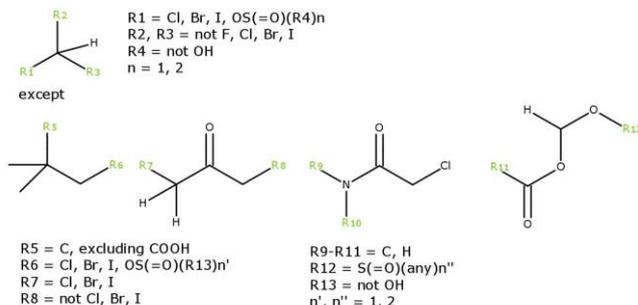
Test Data (methyl methanesulphonate)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	hamster	in vitro chromosome aberration test	Chromosome damage in vitro	positive

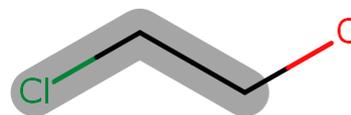
References: Sofuni T (editor). (1999). Revised Edition 1998 Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro., *Data Book of Chromosomal Aberration Test in Vitro*, All pages

 **Alert: 073 Alkylating agent (from KB: Derek KB 2022 1.0)**

Alert Description Image



Match with query compound



Comments

This alert describes the carcinogenicity of alkylating agents (alkyl halides, sulphinates, sulphonates and sulphates), where C is a primary or secondary alkyl carbon atom. In case of alkyl halides C cannot be bonded to any additional halogens. alpha-Halo ethers are excluded from this alert as the carcinogenicity of such compounds is described elsewhere in the knowledge base. C may only be neopentyl if the compound is a beta-halo carboxylic acid or its sulphinate, sulphonate or sulphate equivalent [Ashby et al 1984, Tan et al]. This is based on the observed mutagenicity, at pH 7.4, of 3-chloropivalic acid, which results from intramolecular cyclisation to a mutagenic beta-lactone.

Examples of compounds which fire this alert include diethyl sulphate [IARC 1987, IARC 1992, IARC 1999a] and methyl methanesulphonate [IARC 1999b] which have been classified as group 2A carcinogens by the IARC, following reclassification of methyl methanesulphonate from group 2B [IARC 1974, IARC 1987]. Bromoethane has been classified as a group 3 carcinogen [IARC 1991, IARC 1999c] and there is some evidence for its carcinogenicity in rats and mice, although gender differences were observed, with female mice being the most susceptible [NTP 1989]. 3-Chloro-2-methylpropene was shown to increase the incidence of forestomach hyperplasia and squamous cell papillomas in a dose-related manner in mice and rats [NTP 1986]. The incidence of squamous cell carcinomas of the forestomach was also increased in male mice [NTP 1986].

The following structural classes are excluded from the alert:

1) Primary alpha-halo ketones

Primary alpha-halo ketones are excluded from this alert based on the lack of mutagenic activity observed for this class in the Ames test, which is described elsewhere in the knowledge base. This is supported by data for 4'-chloroacetyl(acetanilide), which has been reported to be non-carcinogenic in rodents [NTP 1979]. The lack of carcinogenic and mutagenic activity may be as a consequence of the reactivity of these substances, as evidence suggests that 2-chloroacetophenone and 4'-chloroacetyl(acetanilide) react preferentially with thiol, rather than hydroxyl or amine, nucleophiles [Ashby et al 1996]. Therefore detoxification with glutathione may be more likely in biological systems rather than reaction with DNA.

2) Chloroacetamides

Chloroacetamides are excluded from this alert, as the active members of this class are likely to induce tumours through a different mechanism of action. This is supported by the lack of direct mutagenicity observed for butachlor, propachlor and acetochlor in Ames test [Hsu et al,

Plewa et al, Ashby et al 1996], even though these compounds have been shown to be carcinogenic in rodents [US EPA]. The mechanism by which these substances are carcinogenic has been suggested to proceed via metabolism of these compounds to DNA-reactive quinonimines, and evidence indicates that these metabolites are formed in the rat, albeit in low concentrations [Jefferies et al]. Additionally, data demonstrates that acetochlor shows little reactivity toward oxygen and amine nucleophiles [Ashby et al 1996].

References

- Ashby J, Callander RD and Gilman D. (1984) . Lack of mutagenicity to *S. typhimurium* of neopentyl bromide and pentaerythrityl tetrachloride: relation to chemical structure., *Mutation Research*, 140 , 71-74, DOI: 10.1016/0165-7992(84)90045-9
- Tan EL, Brimer PA, Schenley RL and Hsie AW. (1983). Mutagenicity and cytotoxicity of dimethyl and monomethyl sulfates in the CHO/HGPRT system., *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 11 , 373-380, DOI: 10.1080/15287398309530351
- Ashby J, Kier L, Wilson AGE, Green T, Lefevre PA, Tinwell H, Willis GA, Heydens WF and Clapp MJL. (1996). Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor., *Human and Experimental Toxicology*, 15 , 702-735
DOI: 10.1177/096032719601500902
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, supplement 7 , 56-74
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1992). Occupational exposures to mists and vapours from strong inorganic acids; and other industrial chemicals., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 54 , 213-228
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1405-1415
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1305-1307
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1991). Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 52 , 299-314
- National Toxicology Program (NTP). (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of bromoethane (ethyl bromide) (CAS RN 74-96-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)., *National Toxicology Program Report*,
- National Toxicology Program (NTP). (1986). Toxicology and carcinogenesis studies of 3-chloro-2-methylpropene (technical grade containing 5% dimethylvinyl chloride) (CAS RN 563-47-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)., *National Toxicology Program Report*
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1974). Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, 7 , 253-260
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1059-1078
- National Toxicology Program (NTP). (1979). Bioassay of 4'-(chloroacetyl)-acetanilide for possible carcinogenicity (CAS RN 140-49-8)., *National Toxicology Program Report*
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). (2009). Chronic and cancer endpoints., *United States Environmental Protection Agency Web Server*

- Hsu KY, Lin HJ, Lin JK, Kuo WS and Ou YH. (2005) Mutagenicity study of butachlor and its metabolites using *Salmonella typhimurium*., *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 38 , 409-416
- Plewa MJ, Wagner ED, Gentile GJ and Gentile JM. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation., *Mutation Research*, 136 , 233-245, DOI: 10.1016/0165-1218(84)90057-0
- Jefferies PR, Quistad GB and Casida JE. (1998)., Dialkylquinonimines validated as in vivo metabolites of alachlor, acetochlor, and metolachlor herbicides in rats., *Chemical Research in Toxicology*, 11 , 353-359, DOI: 10.1021/tx970209z

Validation comments

Carcinogenicity

The alert has demonstrated the following predictive performance:

- 1) CPDB data set: 81 compounds activate this alert of which 61 are reported positive (positive predictivity = 75%)
- 2) ToxRefDB data set: 11 compounds activate this alert of which 6 are reported positive (positive predictivity = 55%)
- 3) Brambilla data set: 18 compounds activate this alert of which 17 are reported positive (positive predictivity = 94%)

1) A collection of carcinogenicity data for 1547 compounds from the following source: Carcinogenic Potency Database (CPDB) downloaded from DSSTox (version 5d, revised 20 November 2008), available at "http://www.epa.gov/NCCT/dsstox/sdf_cpdbas.html".

2) A collection of carcinogenicity data for 337 compounds from the following source: Toxicity Reference Database (ToxRefDB) Chronic & Cancer Endpoints data (downloaded 21 August 2012 from EPA website), which is no longer available. This data set was derived from that described in the following reference: Martin MT, Judson RS, Reif DM, Kavlock RJ and Dix DJ. Profiling chemicals based on chronic toxicity results from the U.S. EPA ToxRef database. *Environmental Health Perspective*, 2009, 117, 3, available at "<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0800074>".

3) A collection of carcinogenicity data for 537 compounds derived from the following references: (i) Brambilla G and Martelli A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 2009, 681, 209-229, available at "<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.09.002>"; (ii) Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L and Martelli A. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 2012, 750, 1-51, available at "<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.09.002>".

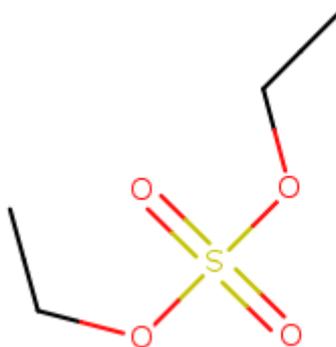
In assessing predictive performance, it should be noted that:

- Mammalian carcinogenicity predictions in Derek associated with a reasoning level of equivocal or above have been considered positive;
- Predictions do not take into account (i) the tautomeric forms of compounds or (ii) the individual components of mixtures;
- The classification of compounds from the CPDB data set as active or inactive is based upon the "ActivityOutcome_CPDBAS_SingleCellCall" field as defined within DSSTox;

- The classification of compounds from the ToxRefDB data set as active or inactive is based upon an overall call assigned from the tumorigenicity summary information. Any active in a single species leads to an overall active call;
- The classification of compounds from the Brambilla data set as active or inactive is based upon carcinogenicity studies in mammals. Consistent reports of activity in a single species leads to an overall active call;
- Compounds in the data sets assigned responses other than active or inactive have been excluded from the analysis;
- No account has been taken of other carcinogenicity alerts which may also be present in some compounds;
- No comparison has been made between the species, strain, gender or route of administration dependency of positive experimental results and the expected profile which may be included in the comments for an alert;
- Information from the data sets may have been used previously as supporting evidence for the derivation of some alerts;
- Some compounds may be present in more than one of the data sets analysed.

 Examples for Alert 073 Alkylating agent

Example 1: diethyl sulphate



CAS Registry Number®: 64-67-5

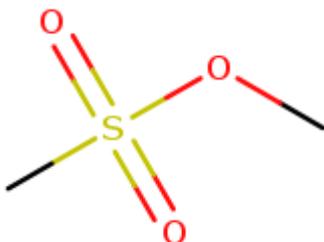
Test Data (diethyl sulphate)

1)	Species various	Assay various	Endpoint(s) Carcinogenicity	Result IARC group 2A
----	---------------------------	-------------------------	---------------------------------------	--------------------------------

References

- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, supplement 7 , 56-74
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999) Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1405-1415
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1992) Occupational exposures to mists and vapours from strong inorganic acids; and other industrial chemicals., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 54 , 213-228

Example 2: methyl methanesulphonate



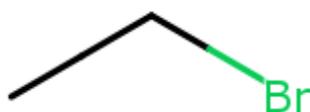
CAS Registry Number®: 66-27-3

Test Data (methyl methanesulphonate)

1)	Species various	Assay various	Endpoint(s) Carcinogenicity	Result IARC group 2A
----	---------------------------	-------------------------	---------------------------------------	--------------------------------

References: International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999) Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1059-1078

Example 3: bromoethane



CAS Registry Number®: 74-96-4

Test Data (bromoethane)

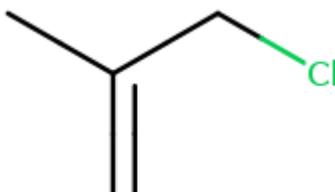
1)	Species various	Assay various	Endpoint(s) Carcinogenicity	Result IARC group 3
----	---------------------------	-------------------------	---------------------------------------	-------------------------------

References

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1999) Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part three)., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 71 , 1305-1307

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1991) Chlorinated drinking-water; chlorination by-products; some other halogenated compounds; cobalt and cobalt compounds., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 52 , 299-314

Example 4: 3-chloro-2-methylpropene



CAS Registry Number®: 563-47-3

Test Data (3-chloro-2-methylpropene)

1)	Species mouse	Assay chronic carcinogenicity study	Endpoint(s) Carcinogenicity	Result positive
----	-------------------------	---	---------------------------------------	---------------------------

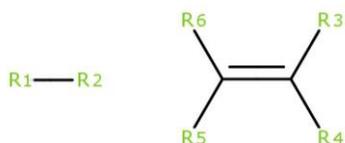
References : National Toxicology Program (NTP). (1986) Toxicology and carcinogenesis studies of 3-chloro-2-methylpropene (technical grade containing 5% dimethylvinyl chloride) (CAS RN 563-47-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)., *National Toxicology Program Report*

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rat	chronic carcinogenicity study	Carcinogenicity	positive

References: National Toxicology Program (NTP). (1986) Toxicology and carcinogenesis studies of 3-chloro-2-methylpropene (technical grade containing 5% dimethylvinyl chloride) (CAS RN 563-47-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)., *National Toxicology Program Report*

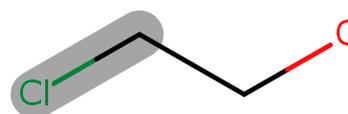
Alert: 617 Halogenated hydrocarbon (from KB: Derek KB 2022 1.0)

Alert Description Image



R1 = Cl, Br, I
R2 = alkyl group with less than 5 carbon atoms
R3 = F, Cl, Br, I
R4-R6 = C, H, F, Cl, Br, I
Halothane or analogues are excluded

Match with query compound



Comments

This alert describes the hepatotoxicity of halogenated aliphatic hydrocarbons. These compounds may cause necrosis and/or steatosis, and liver tumours in humans and experimental animals.

Haloaliphatic hydrocarbons have been extensively used in the chemical and agricultural industry, in medicine, and domestically as solvents and chemical reagents [Zimmerman].

These compounds are known occupational and environmental toxicants. Many of them are thought to possess a potential for causing liver damage [Zimmerman]. Acute hepatic injury in the form of centrilobular necrosis and macrovacuolar steatosis has been reported with the most toxic agents. Typical examples include carbon tetrachloride, widely employed as an experimental model for the study of certain hepatotoxic effects, chloroform, formerly used as an anaesthetic agent, tetrachloroethane, vinyl chloride and tetrachloroethylene. Chronic injury characterised by cirrhosis and/or hepatic carcinoma has also been described with the cited agents [Zimmerman].

Necrosis, degeneration, steatosis, cirrhosis and liver tumours have been reproduced in many species with carbon tetrachloride. A dose-effect response has been established and biochemical changes have been noted within hours following the administration of the chemical [Zimmerman, Aleksunes et al, Litterst et al, IARC]. Chloroform, tetrachloroethane, vinyl chloride, tetrachloroethylene and several other halogenated compounds have shown similar injuries mainly in rats and mice [Constan et al, Larson et al, NTP 1983, Feron et al, Conolly et al, Maltoni and Lefemine, NTP 1986, IARC, Raucy et al, Zimmerman]. Chloroform has

additionally been reported with extensive regenerative cell proliferation and cytolethality [Constan et al].

The hepatotoxicity is thought to require metabolic activation of the parent compound primarily mediated by CYP2E1. Formation of intermediates occurs via dehalogenation, reduction, or reductive oxygenation, with certain hydrocarbons undergoing all three reaction types [Zimmerman, Constan et al, Raucy et al, Reynolds et al, Lash and Parker]. Current hypotheses hold that toxicity increases as the numbers of halogens, size and ease of homolytic cleavage of the molecule increase [Zimmerman]. Carbon tetrachloride toxicity has been attributed to its ability to undergo a reduction pathway leading to the trichloromethyl radical CCl_3^* . This radical can covalently bind to cellular molecules, impairing crucial cellular processes such as lipid metabolism, form adducts with DNA or generate oxidative stress. Depending on the oxygen concentration, the cited free radical may be converted to its peroxy form CCl_3COO^* , secondary radicals and by-products (e.g. phosgene, carbene-type products, and reactive aldehydes) also suspected to initiate the pathogenesis [Zimmerman, Weber et al]. There is a general agreement that lipid peroxidation in cell membranes, followed by ionic and enzymatic chaos plays a causative role [Zimmerman, Weber et al]. Regarding chloroform and halogenated olefins, there is evidence for the formation of an electrophilic rather than a free radical intermediate [Constan et al, Lash and Parker, van Duuren]. Phosgene has been proven to be the ultimate toxin for the former and several studies have supported the view that carcinogenicity stems from recurrent cytotoxicity and chronic cellular regeneration [Constan et al, Pohl et al]. A common mechanism for vinyl chloride and structural analogues may be through the formation of their corresponding epoxide, haloaldehyde or haloacylhalide derivatives [Zimmerman, van Duuren, Raucy et al, Lash and Parker].

The scope of the alert is based on the physico-chemical considerations reviewed by Zimmerman and mentioned above. The alert includes i) chloro, bromo or iodo derivatives containing less than 5 carbon atoms and ii) any halogenated olefins on the basis of the toxicity data provided by Conolly *et al*. Halothane and analogues are excluded and constitute a separate alert by virtue of their toxicological response.

References

- Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver., *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver*
- Aleksunes LM, Slitt AM, Cherrington NJ, Thibodeau MS, Klaassen CD and Manautou JE. (2005) Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride., *Toxicological Sciences*, 83 , 44-52, DOI: 10.1093/toxsci/kfi013
- Conolly RB, Jaeger RJ and Szabo S. (1978) Acute hepatotoxicity of ethylene, vinyl fluoride, vinyl chloride, and vinyl bromide after Aroclor 1254 pretreatment., *Experimental and Molecular Pathology*, 28 , 25-33, DOI: 10.1016/0014-4800(78)90060-6
- Constan AA, Sprankle CS, Peters JM, Kedderis GL, Everitt JI, Wong BA, Gonzalez FL and Butterworth BE. (1999) Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160 , 120-126, DOI: 10.1006/taap.1999.8756
- Feron VJ, Spit BJ, Immel HR and Kroes R. (1979) One-year time-sequence inhalation toxicity study of vinyl chloride in rats. III. Morphological changes in the liver., *Toxicology*, 13 , 143-154, DOI: 10.1016/S0300-483X(79)80018-9
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979), Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572
- Larson JL, Templin MV, Wolf DC, Jamison KC, Leininger JR, Mery S, Morgan KT, Wong BA, Conolly RB and Butterworth BE. (1996) A 90-day chloroform inhalation study in female and

- male B6C3F1 mice: implications for cancer risk assessment., *Fundamental and Applied Toxicology*, 30 , 118-137, DOI: 10.1006/faat.1996.0049
- Lash LH and Parker JC. (2001) Hepatic and renal toxicities associated with perchloroethylene., *Pharmacological Reviews*, 53 , 177-208
- Litterst CL, Farber TM and Van Loon EJ. (1973) Potentiation of CCl4-induced hepatotoxicity in the dog by chronic exposure to phenobarbital., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 25 , 354-362, DOI: 10.1016/0041-008X(73)90309-8
- National Toxicology Program (NTP). (1983) Carcinogenesis studies of 1,1,1,2-tetrachloroethane (CAS RN 630-20-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)., *National Toxicology Program Report*, , 1-146
- National Toxicology Program (NTP). (1986) Toxicology and carcinogenesis studies of tetrachloroethylene (perchloroethylene) (CAS RN 127-18-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)., *National Toxicology Program Report*, 1-197
- Pohl LR, Bhooshan B, Whittaker NF and Krishna G. (1977) Phosgene: a metabolite of chloroform., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 79 , 684-691, DOI: 10.1016/0006-291X(77)91166-4
- Raucy JL, Kraner JC and Lasker JM. (1993) Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P450E1. *Critical Reviews in Toxicology* 23, 1-20, DOI: 10.3109/10408449309104072
- Reynolds ES, Moslen MT, Szabo S, Jaeger RJ and Murphy SD. (1975) Hepatotoxicity of vinyl chloride and 1,1-dichloroethylene., *The American Journal of Pathology*, 81 , 219-231
- van Duuren BL. (1977) Chemical structure, reactivity, and carcinogenicity of halohydrocarbons., *Environmental Health Perspectives*, 21 , 17-23
- Weber LWD, Boll M and Stampfl A. (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model., *Critical Reviews in Toxicology*, 33 , 105-136, DOI: 10.1080/713611034
- Maltoni C and Lefemine G. (1975) Carcinogenicity bioassays of vinyl chloride: current results., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 246 , 195-218, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb51094.x

 Examples for Alert 617 Halogenated hydrocarbon

Example 1: vinyl chloride



CAS Registry Number®: 75-01-4

Test Data (vinyl chloride)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	human	hepatotoxicity case study	Hepatotoxicity	positive
References: Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver				
2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rat	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References

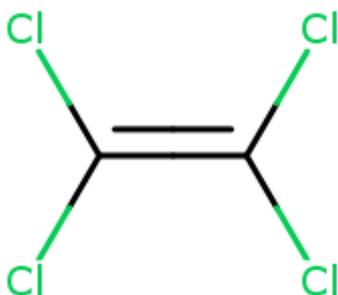
Maltoni C and Lefemine G. (1975) Carcinogenicity bioassays of vinyl chloride: current results., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 246 , 195-218, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb51094.x

Conolly RB, Jaeger RJ and Szabo S. (1978) Acute hepatotoxicity of ethylene, vinyl fluoride, vinyl chloride, and vinyl bromide after Aroclor 1254 pretreatment., *Experimental and Molecular Pathology*, 28 , 25-33, DOI: 10.1016/0014-4800(78)90060-6

3)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	mouse	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References: Maltoni C and Lefemine G. (1975) Carcinogenicity bioassays of vinyl chloride: current results., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 246 , 195-218, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb51094.x

Example 2: tetrachloroethylene



CAS Registry Number®: 127-18-4

Test Data (tetrachloroethylene)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	human	hepatotoxicity case study	Hepatotoxicity	positive

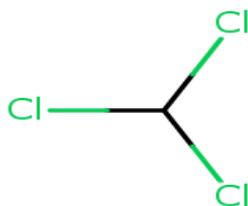
References : Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	mouse	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References

National Toxicology Program (NTP). (1986) Toxicology and carcinogenesis studies of tetrachloroethylene (perchloroethylene) (CAS RN 127-18-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)., *National Toxicology Program Report*, , 1-197

Example 3: chloroform



CAS Registry Number®: 67-66-3

Test Data (chloroform)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	human	hepatotoxicity case study	Hepatotoxicity	positive

References

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	mouse	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References

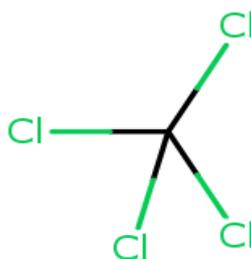
Constan AA, Sprankle CS, Peters JM, Kedderis GL, Everitt JI, Wong BA, Gonzalez FL and Butterworth BE. (1999) Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160 , 120-126, DOI: 10.1006/taap.1999.8756

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

3)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rat	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References : International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

Example 4: carbon tetrachloride



CAS Registry Number®: 56-23-5

Test Data (carbon tetrachloride)

	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
1)	human	hepatotoxicity case study	Hepatotoxicity	positive

References

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572
Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver

2)	mouse	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive
----	-------	----------------------	----------------	----------

References: International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

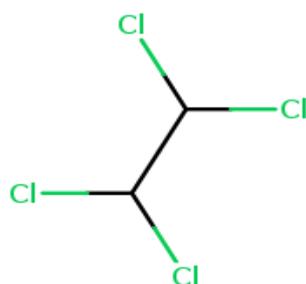
3)	dog	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive
----	-----	----------------------	----------------	----------

References: Litterst CL, Farber TM and Van Loon EJ. (1973) Potentiation of CCl4-induced hepatotoxicity in the dog by chronic exposure to phenobarbital., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 25 , 354-362, DOI: 10.1016/0041-008X(73)90309-8

4)	rat	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive
----	-----	----------------------	----------------	----------

References: International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

Example 5: 1,1,2,2-tetrachloroethane



CAS Registry Number®: 79-34-5

Test Data (1,1,2,2-tetrachloroethane)

1)	human	hepatotoxicity case study	Hepatotoxicity	positive
----	-------	---------------------------	----------------	----------

References

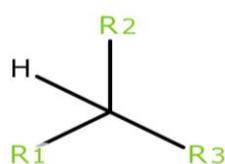
International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572
Zimmerman HJ. (1999) Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and other Chemicals on the Liver

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	mouse	hepatotoxicity study	Hepatotoxicity	positive

References: International Agency for Research on Cancer (IARC). (1979) Some halogenated hydrocarbons., *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 20 , 371-572

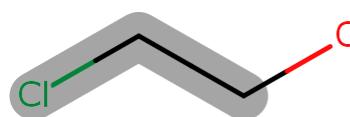
Alert: 922 Alkyl halide (from KB: Derek KB 2022 1.0)

Alert Description Image



R1, R2 = H, C, F, Cl, Br, I
R3 = Cl, Br, I

Match with query compound



Comments

Skin irritation/corrosion: rabbit study, 4-hour human patch test, reconstructed human epidermis test method

This alert describes the skin irritation/corrosion potential of primary and secondary alkyl halides, excluding alkyl fluorides. This class is generally irritating in vivo and in vitro, although activated alkyl halides show a higher propensity for corrosivity.

A number of primary and secondary alkyl halides have been found to be irritating in vivo and in vitro, including iodomethane [ECHA 2001], 1-bromohexane [Basketter et al, ECETOC], dichloromethane [ECETOC] and alpha,alpha-dichlorotoluene [ECHA 2019]. Some alkyl halides containing adjacent activating functional groups, such as allyl groups and carbonyls, are corrosive in vivo and in vitro. Examples include 3-bromopropene [ECHA 1993], glycol bromoacetate [Liebsch et al] and ethyl 2-chloroacetoacetate [ECHA 2010].

The mechanism by which primary and secondary alkyl halides induce skin irritation and corrosion is unclear. Alkyl halides are SN2-reactive electrophiles [Aptula and Roberts], which may have an impact on their skin irritation/corrosion potential [Walker et al].

The scope of this alert has been defined by the available skin irritation/corrosion data for this class and the potential mechanism of action. Primary or secondary alkyl halides can be substituted with additional hydrogen, carbon or halogen atoms. Activated alkyl halides are included in the scope of this alert, for example allyl and benzyl halides, alpha-haloketones and esters, and di-/tri-haloalkanes. Alkyl fluorides have been excluded from this alert as there is little evidence to show that they are a source of skin irritation/corrosion potential, possibly due to their low reactivity resulting from the strength of the carbon-fluorine bond. Corrosive alkyl halides generally have lower molecular weights and lower log P values than irritant or non-irritant alkyl halides.

References

- Liebsch M, Traue D, Barrabas C, Spielmann H, Uphill P, Wilkins S, McPherson JP, Wiemann C, Kaufmann T, Remmele M and Holzhutter HG. (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing., *Alternatives to Laboratory Animals*, 28 , 371-401, DOI: 10.1177/026119290002800309
- European Chemicals Agency (ECHA). (2001) Skin irritation/corrosion study for iodomethane (CAS RN 74-88-4)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*
- European Chemicals Agency (ECHA). (1993) Skin irritation/corrosion study for 3-bromopropene (CAS RN 106-95-6)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*
- European Chemicals Agency (ECHA). (2010) Skin irritation/corrosion study for ethyl 2-chloroacetoacetate (CAS RN 609-15-4)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*
- European Chemicals Agency (ECHA). (2019) Skin irritation/corrosion study for alpha,alpha-dichlorotoluene (CAS RN 98-87-3)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*
- Aptula AO and Roberts DW. (2006) Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity., *Chemical Research in Toxicology*, 19 , 1097-1105, DOI: 10.1021/tx0601004
- Walker JD, Gerner I, Hulzebos E and Schlegel K. (2004) (Q)SARs for predicting skin irritation and corrosion: mechanisms, transparency and applicability of predictions., *QSAR & Combinatorial Science*, 23 , 721-725, DOI: 10.1002/qsar.200430879
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (1995) Skin irritation and corrosion: reference chemicals data bank., *ECETOC Technical Report*, 66 , 1-247
- Basketter D, Jirova D and Kandarova H. (2012) Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: a regulatory perspective., *Interdisciplinary Toxicology*, 5 , 98-104 DOI: 10.2478/v10102-012-0017-2

Examples for Alert 922 Alkyl halide

Example 1: dichloromethane



CAS Registry Number®: 75-09-2

Test Data (dichloromethane)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rabbit	skin irritation study	Skin irritation/corrosion	positive

References: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (1995) Skin irritation and corrosion: reference chemicals data bank., *ECETOC Technical Report*, 66 , 1-247

Example 2: iodomethane



CAS Registry Number®: 74-88-4

Test Data (iodomethane)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rabbit	skin irritation study	Skin irritation/corrosion	irritant

References: European Chemicals Agency (ECHA). (2001) Skin irritation/corrosion study for iodomethane (CAS RN 74-88-4)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*

Example 3: 1-bromohexane



CAS Registry Number®: 111-25-1

Test Data (1-bromohexane)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rabbit	skin irritation study	Skin irritation/corrosion	positive

References: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (1995) Skin irritation and corrosion: reference chemicals data bank., *ECETOC Technical Report*, 66 , 1-247

2)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	human	patch test	Skin irritation/corrosion	irritant

References: Basketter D, Jirova D and Kandarova H. (2012) Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: a regulatory perspective., *Interdisciplinary Toxicology*, 5 , 98-104, DOI: 10.2478/v10102-012-0017-2

Example 4: 3-bromopropene



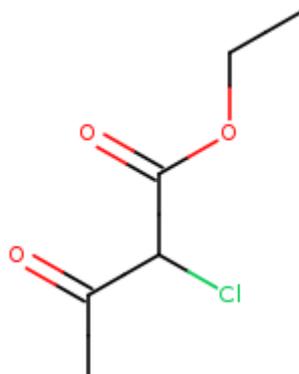
CAS Registry Number®: 106-95-6

Test Data (3-bromopropene)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	rabbit	skin irritation study	Skin irritation/corrosion	corrosive

References: European Chemicals Agency (ECHA). (1993) Skin irritation/corrosion study for 3-bromopropene (CAS RN 106-95-6)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*

Example 5: ethyl 2-chloroacetoacetate



CAS Registry Number®: 609-15-4

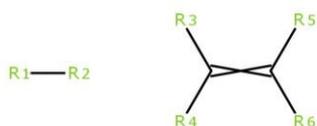
Test Data (ethyl 2-chloroacetoacetate)

1)	Species	Assay	Endpoint(s)	Result
	human	reconstructed human epidermis test	Skin irritation/corrosion	corrosive

References: European Chemicals Agency (ECHA). (2010) Skin irritation/corrosion study for ethyl 2-chloroacetoacetate (CAS RN 609-15-4)., *European Chemicals Agency Registration Dossier*

Alert: RapidPrototype110 Halogenated hydrocarbon (from KB: Derek KB 2022 1.0)

Alert Description Image



R1 = Cl, Br, I
R2 = C#, alkyl group with less than 5 carbon atoms
R3-R5 = H, C, F, Cl, Br, I
R6 = F, Cl, Br, I
Atom marked # can only be attached to H, F, Cl, Br, I
Halothane or analogues are excluded

Match with query compound



Comments

This alert describes the mitochondrial dysfunction caused by halogenated hydrocarbons. This is a rapid prototype alert derived using a proprietary data set of 362 compounds and two published data sets of 105 [Mehta et al] (data set A) and 283 compounds [Zhang et al] (data set B) respectively. Compounds were classified on the basis of their uncoupling/inhibitory activity on oxidative phosphorylation (proprietary data set) or their reported effects on mitochondria in the published literature (published data sets A and B).

1) Proprietary data set: 4 compounds activate this rapid prototype alert of which 2 are reported positive

2) Published data set A: 2 compounds activate this rapid prototype alert of which 2 are reported positive

3) Published data set B: 1 compound activates this rapid prototype alert of which 1 is reported positive

References

Mehta R, Chan K, Lee O, Tafazoli S and O'Brien PJ. (2008) Drug-associated mitochondrial toxicity., *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, , 71-126
Zhang H, Chen QY, Xiang ML, Ma CY, Huang Q and Yang SY. (2009) In silico prediction of mitochondrial toxicity by using GA-CG-SVM approach., *Toxicology in Vitro*, 23 , 134-140
DOI: 10.1016/j.tiv.2008.09.017

Reasoning Details

Carcinogenicity in mammal is PLAUSIBLE (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause carcinogenicity; your selected species, which is mammal.

Rule 173: If [alert 073] is [certain] then [Carcinogenicity alert set 1] is [certain]
 alert 073 is CERTAIN

If a chemical contains alert 73 then it is a member of "Carcinogenicity alert set 1".
Membership of "Carcinogenicity alert set 1" indicates the presence of a carcinogenicity alert associated with a genotoxic mechanism of action.

Rule 243: If [species mammal] is [certain] then [Species dependent variable 22] is [plausible]
 species mammal is CERTAIN

In mammals the variable "Species dependent variable 22" is plausible.

Rule 210: If [Carcinogenicity alert set 1] is [certain] then [Carcinogenicity] is [Species dependent variable 22]
 Carcinogenicity alert set 1 is CERTAIN
 Species dependent variable 22 is PLAUSIBLE

If a chemical is a member of "Carcinogenicity alert set 1" then it is considered plausible that the chemical will cause carcinogenicity in mammals and impossible in bacteria. The variation in rule outcome with species is achieved via use of the variable "Species dependent variable 22".

Chromosome damage in vitro in mammal is PLAUSIBLE (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause chromosome damage; your selected species, which is mammal.

Rule 243: If [species mammal] is [certain] then [Species dependent variable 22] is [plausible]
 species mammal is CERTAIN

In mammals the variable "Species dependent variable 22" is plausible.

Rule 779: If [alert 027] is [certain] then [Chromosome damage in vitro] is [Species dependent variable 22]

- alert 027 **is** CERTAIN
- Species dependent variable 22 **is** PLAUSIBLE

If a chemical contains alert 027 then it is considered plausible that the chemical will cause chromosome damage in vitro in mammals and impossible in bacteria. The variation in rule outcome with species is achieved via use of the variable "Species dependent variable 22".

Hepatotoxicity in mammal is PLAUSIBLE (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause hepatotoxicity; your selected species, which is mammal.

Rule 243: If [species mammal] is [certain] then [Species dependent variable 22] is [plausible]

- species mammal **is** CERTAIN

In mammals the variable "Species dependent variable 22" is plausible.

Rule 1294: If [alert 617] is [certain] then [Hepatotoxicity] is [Species dependent variable 22]

- alert 617 **is** CERTAIN
- Species dependent variable 22 **is** PLAUSIBLE

If a chemical contains alert 617 then it is considered plausible that the chemical will cause hepatotoxicity in mammals and impossible in bacteria. The variation in rule outcome with species is achieved via use of the variable "Species dependent variable 22".

Mitochondrial dysfunction in mammal is EQUIVOCAL (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause mitochondrial dysfunction; your selected species, which is mammal.

Rule 266: If [species mammal] is [certain] then [Species dependent variable 8] is [equivocal]

- species mammal **is** CERTAIN

In mammals the variable "Species dependent variable 8" is equivocal.

Rule 1033: If [Mitochondrial dysfunction alert] is [certain] then [Mitochondrial dysfunction] is [Species dependent variable 8]

- Mitochondrial dysfunction alert **is** CERTAIN
- Species dependent variable 8 **is** EQUIVOCAL

If a chemical contains a rapid prototype alert for mitochondrial dysfunction then it is considered equivocal that the chemical will cause mitochondrial dysfunction in mammals and impossible in bacteria. The variation in rule outcome with species is activated via use of the variable "Species dependent variable 8".

Mutagenicity in vitro in bacterium is PLAUSIBLE (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause mutagenicity; your selected species, which is bacterium.

Rule 610: If [species bacterium] is [certain] then [Species dependent variable 27] is [plausible]

- species bacterium **is** CERTAIN

In bacteria the variable "Species dependent variable 27" is plausible.

Rule 82: If [alert 027] is [certain] then [Mutagenicity in vitro] is [Species dependent variable 27]

- alert 027 **is** CERTAIN
- Species dependent variable 27 **is** PLAUSIBLE

If a chemical contains alert 27 then it is considered plausible that the chemical will cause mutagenicity in vitro in bacteria. The variation in rule outcome with species is achieved via use of the variable "Species dependent variable 27".

Skin irritation/corrosion in mammal is PLAUSIBLE (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause skin irritation/corrosion; your selected species, which is mammal.

Rule 243: If [species mammal] is [certain] then [Species dependent variable 22] is [plausible]

- species mammal **is** CERTAIN

In mammals the variable "Species dependent variable 22" is plausible.

Rule 1621: If [alert 922] is [certain] then [Skin irritation/corrosion] is [Species dependent variable 22]

- alert 922 **is** CERTAIN
- Species dependent variable 22 **is** PLAUSIBLE

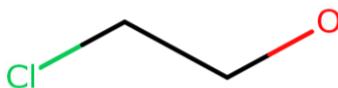
If a chemical contains alert 922 then it is considered plausible that the chemical will cause skin irritation/corrosion in mammals and impossible in bacteria. The variation in rule outcome with species is achieved via use of the variable "Species dependent variable 22".

Skin sensitisation in mammal is NON-SENSITISER (from KB: Derek KB 2022 1.0)

The parameters that have influenced your prediction are: substructures in the input structure, which have the potential to cause skin sensitisation; your selected species, which is mammal.

Overview

No misclassified or unclassified features



Details

The query structure does not match any structural alerts or examples for skin sensitisation in Derek. Additionally, the query structure does not contain any unclassified or misclassified features and is consequently predicted to be a non-sensitiser.

Glossary

Certain

There is proof that the proposition is true.

Probable

There is at least one strong argument that the proposition is true and there are no arguments against it.

Plausible

The weight of evidence supports the proposition.

Equivocal

There is an equal weight of evidence for and against the proposition.

Doubted

The weight of evidence opposes the proposition.

Improbable

There is at least one strong argument that the proposition is false and there are no arguments that it is true.

Impossible

There is proof that the proposition is false.

Open

There is no evidence that supports or opposes the proposition.

Contradicted

There is proof that the proposition is both true and false.

Inactive, no misclassified or unclassified features

The query structure does not match any structural alerts or examples in Derek which show activity in a bacterial reverse mutation assay (Ames test). Additionally, the query structure does not contain any unclassified or misclassified features.

Inactive, contains misclassified features

Features in the molecule are found in non-alerting mutagens in the Lhasa reference set. The prediction remains negative and the misclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Inactive, contains unclassified features

Some features in the molecule have not been found in the Lhasa reference set. The prediction remains negative and the unclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Inactive, contains misclassified and unclassified features

The query structure contains features that are misclassified and features that are unclassified. These are highlighted on the structure.

Non-sensitiser, no misclassified or unclassified features

The query structure does not match any structural alerts or examples for skin sensitisation in Derek. Additionally, the query structure does not contain any unclassified or misclassified features.

Non-sensitiser, contains misclassified features

Features in the molecule are found in non-alerting sensitisers in the Lhasa skin sensitisation negative prediction dataset. The prediction remains negative and the misclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Non-sensitiser, contains unclassified features

Some features in the molecule have not been found in the Lhasa skin sensitisation negative prediction dataset. The prediction remains negative and the unclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Non-sensitiser, contains misclassified and unclassified features

The query structure contains features that are misclassified and features that are unclassified. These are highlighted on the structure.

CAS Registry Numbers® (CAS RN®)

CAS Registry Numbers® are the intellectual property of the American Chemical Society; and are used by Lhasa Limited with the express permission of CAS. CAS Registry Numbers® have not been verified by CAS and may be inaccurate. Expert data scientists at Lhasa Limited cross reference CAS Registry Numbers® against multiple sources to achieve a high level of accuracy.

Copyright and Database Right Notice

© Copyright, Lhasa Limited, 2022. All rights reserved

The Derek Nexus software, the content of reports generated by the use of that software, and the technical documentation relating to that software are proprietary to Lhasa Limited, and are protected by copyrights, database rights and similar intellectual property rights in jurisdictions all over the world.

The use of Lhasa Limited software, and the copying, distribution and other exploitation of the content of reports generated by the use of Lhasa Limited software and associated technical documentation, requires a licence from Lhasa.

Any unlicensed use of those assets will constitute an infringement of Lhasa's copyrights and/or database rights and/or other intellectual property rights in those assets.

Lhasa will take enforcement action in respect of any such intellectual property right infringements.

**ANNEXE 4 : RESUME DES ETUDES SUR LA GENOTOXICITE CONSIDEREES POUR
L'APPROCHE WEIGHT OF EVIDENCE**

Paramètres biologiques	Tests	Systèmes d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références	
Mutations géniques <i>in vitro</i>	Test d'Ames	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535, TA1530 et/ou TA100)	Avec et/ou sans activation métabolique	Positif	Rosenkranz et al., 1974	Cités dans NTP, 1985
				Positif	Rosenkranz and Wlodkowski, 1974	
				Positif	Bartsch et al., 1975	
				Positif	Malaveille et al., 1975	
				Positif	McCann et al., 1975	
				Positif	Rannug et al., 1976	
				Positif	Lofroth, 1978	
				Positif	Nakamura et al., 1979	
				Positif	Rannug and Beije, 1979	
				Positif	Bignami et al., 1980a,b	
				Positif	Pfeiffer and Dunkelberg, 1980	
				Positif	Stolzenberg and Hine, 1980	
				Négatif	Elmore et al., 1976	
				Négatif	Laumbachetal., 1977	
	Négatif	Norpoth et al., 1980				
			<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535 et TA1537)	Pureté du 2-CE: 99% Avec (S9) ou sans activation métabolique 2 expériences indépendantes (3 boîtes/dose) Méthode par pré-incubation Doses testées: de 333 à 10000 µg/boîte	Positif sur TA1535 avec S9 aux doses de 3333, 6667 et 10000 µg/boîte	Haworth et al., 1983; NTP 1985
			<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535)	Sans activation métabolique	Négatif à faibles doses (0,1 - 0,5 - 1,5 mM) Faiblement positif à la forte dose de 1000 mM (et faiblement cytotoxique)	Rannug et al., 1976
			<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535)	2-chloroacétaldéhyde sans activation métabolique	Positif dès les faibles doses	Rannug et al., 1976
			<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535 et TA100)	Avec (S9) ou sans activation métabolique	Positif avec et sans S9 à fortes doses Effet plus important avec S9	Bignami et al., 1980
			<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535 et TA100)	2-chloroacétaldéhyde Avec (S9) ou sans activation métabolique	Positif sur TA100 sans S9	Bignami et al., 1980
		<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535 et TA100)	Avec (S9) ou sans activation métabolique	Négatif sans S9 Faiblement positif sur TA1535 avec S9 Fortement positif sur TA100 avec S9	McCann et al., 1975	
		<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535 et TA100)	2-chloroacétaldéhyde Sans activation métabolique	Positif sur TA100	McCann et al., 1975	
		<i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) <i>Escherichia coli</i> (WP2 uvrA)	Etude notée Klimisch 2 et considérée comme « étude clé » par l'ECHA. Essai réalisé par le JETOC conformément aux lignes directrices du Ministère du travail japonais Pureté du 2-CE: 99,2% 2 essais indépendants (2 boîtes/dose) Méthode par pré-incubation Avec ou sans activation métabolique (S9) Doses testées: de 50 à 5000 µg/boîte	Absence de cytotoxicité à la dose maximale de 5000 µg/boîte. Positif sur <i>E.coli</i> WP2 uvrA avec S9	ECHA, 2022 Dossier d'enregistrement REACH du 2-CE (étude datant de 1996)	
		<i>Escherichia coli</i>		Positif	Norpoth et al., 1980	
		<i>Klebsiella pneumonia</i>		Positif	Voogd and van der Vet, 1969; Voogd et al., 1972; Voogd, 1973 cités dans NTP, 1985	
		<i>Streptomyces coelicolor</i>		Négatif	Bignami et al., 1980a,b cités dans NTP, 1985	
		<i>Aspergillus nidulans</i>		Positif	Bignami et al., 1980a,b cités dans NTP, 1985	
		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		Négatif	Knaap et al., 1982 cité dans NTP 1985	
		<i>Drosophila melanogaster</i>		Négatif	Knaap et al., 1982 cité dans NTP 1985	
	Test au locus HGPRT	Cellules de hamster chinois V79 (test au locus HGPRT)	3h de traitement Sans activation métabolique Doses testées: ≤ 2500 µM	Négatif	Huberman et al., 1975	
	Test au locus HGPRT	Cellules de hamster chinois V79 (test au locus HGPRT)	Chloroacétaldéhyde 3h de traitement Sans activation métabolique Doses testées: 1,6 à 12,8 µM	Positif dès la dose de 6,4 µM	Huberman et al., 1975	
	Test au locus HGPRT	Cellules de lymphome de souris L5178Y (test au locus HGPRT)	2h de traitement Sans activation métabolique Doses testées: 10 et 100 mM	Négatif	Knaap et al., 1982	

Paramètres biologiques	Tests	Systèmes d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Aberrations chromosomiques in vitro	Test SCE	Cellules de hamster chinois CHO-WBL	Pureté du 2-CE: 99% Avec (S9) et sans activation métabolique 25h de traitement sans S9 2h de traitement avec S9	Positif sans S9 à partir de 1200 µg/mL Positif avec S9 à 119,1 et 396,6 µg/mL Retard dans la progression du cycle cellulaire à des doses ≥ 5000 µg/mL	Ivett et al., 1989
	Test d'aberrations chromosomiques	Cellules de hamster chinois CHO-WBL	Pureté du 2-CE: 99% Avec (S9) et sans activation métabolique Sans S9: 8h de traitement + 2-2,5h de recouvrement Avec S9: 2h de traitement + 10-10,5h de recouvrement Avec S9: 2h de traitement + 20h de recouvrement	Positif sans S9 à des doses > 5000 µg/mL Positif avec S9 à 980 et à 2000 µg/mL après un temps de récolte retardé de 20h	Ivett et al., 1989
	Test d'aberrations chromosomiques	Cellules de hamster chinois CHO-K1	Avec (S9) et sans activation métabolique 24h de traitement sans recouvrement Doses testées: 5, 7,5 et 10 mM	Négatif	Liao et al., 2011
	Test d'aberrations chromosomiques	Cellules de hamster chinois CHO-K1	2-chloroacétaldéhyde Avec (S9) et sans activation métabolique 24h de traitement sans recouvrement Doses testées: 0,175, 0,263 et 0,35 mM	Négatif sans S9 Positif avec S9 à 0,263 et 0,35 mM (60,5% de gaps de chromosomes, 20,1% de cassures de chromosomes et 19,4% d'échanges de chromosomes)	Liao et al., 2011
	Test du micronoyau	Cellules hépatiques humaines HepaRG		Négatif	cité dans EFSA, 2022
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Négatif	Loprieno et al., 1977 cité dans NTP 1985

Paramètres biologiques	Tests	Systèmes d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Dommages à l'ADN, stress cellulaire, stress oxydatif, stress protéique <i>in vitro</i>	ToxTracker®	Cellules souches embryonnaires de souris avec des gènes rapporteurs couplés à la GFP		Négatif	Wills et al., 2021
Altérations transcriptomiques <i>in vitro</i>		Cellules humaines hépatiques HepG2	Traitement de 24 ou 48h	Le 2-CE est classé comme génotoxique <i>in vivo</i> d'après une méthode de prédiction présentant une concordance de 89%, une spécificité de 87% et une sensibilité de 91%	Magkoufopoulou <i>et al.</i> , 2012

Paramètres biologiques	Tests	Systèmes d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références
Dommages à l'ADN <i>in vivo</i>	Test de déroulement de l'ADN à pH alcalin	Souris B6C3F1 mâles (foie)	Voie intraveineuse Doses testées: de 0,3 à 1,2 mmol/kg p.c Sacrifice 4h après le traitement	Négatif	Storer and Conolly, 1985
	Test UDS	Rats Sprague-Dawley albino mâles (foie)	5 animaux/groupe Voie orale (gavage) Dose testée: 45,5 mg/kg p.c. 1 ou 2 traitements à 24h d'intervalle	Négatif	Allavena et al., 1992
	Test d'éluion alcaline	Rats Sprague-Dawley albino mâles (foie)	5 animaux/groupe Voie orale (gavage) Dose testée: 45,5 mg/kg p.c. 1 ou 2 traitements à 24h d'intervalle	Négatif	Allavena et al., 1992
	Test d'éluion alcaline	Rats Sprague-Dawley femelles (foie)	8-9 animaux/groupe Voie orale (gavage) Doses testées: 18 et 54 mg/kg p.c. Sacrifice 4h et 21h après le traitement	Négatif	Kitchin et al., 1992

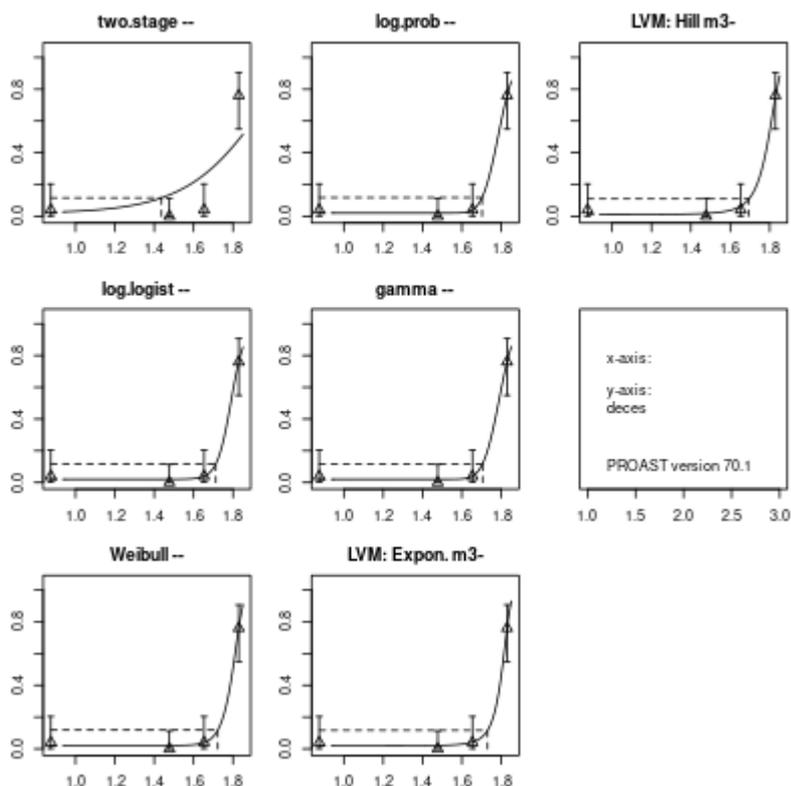
Paramètres biologiques	Tests	Systèmes d'essai	Conditions expérimentales	Résultats	Références	
Aberrations chromosomiques in vivo	Test d'aberrations chromosomiques	Rats (moelle osseuse)	Voie respiratoire	Positif	Isakova et al., 1971	cité dans NTP 1985
	Test d'aberrations chromosomiques	Souris Swiss mâles (moelle osseuse)	5 animaux/groupe Voie intrapéritonéale: 0,05 mL/kg 2 injections à 24h d'intervalle Sacrifice 6h après de dernier traitement	Négatif	Conan et al., 1979	
	Test du micronoyau	Souris Swiss mâles (moelle osseuse)	Voie orale: 0,025; 0,050; 0,075 et 0,100 mL/kg (3 à 5 animaux/groupe) Voie intrapéritonéale: 0,01 et 0,05 mL/kg (5 animaux/groupe) 2 traitements à 24h d'intervalle Sacrifice 6h après de dernier traitement	Négatif Augmentation statistiquement non significative à forte dose par voie orale	Conan et al., 1979	
	Test du micronoyau	Rats Sprague-Dawley albino mâles (foie)	5 animaux/groupe Voie orale (gavage) Dose testée: 45,5 mg/kg p.c. 1 traitement 20h après hepatectomie partielle, sacrifice 48h après le traitement ou 2 traitements à 24h d'intervalle, sacrifice 6h après le 2nd traitement	Négatif	Allavena et al., 1992	
	Test du micronoyau	Souris B6C3F1 mâles (moelle osseuse)	5 animaux/groupe Voie intrapéritonéale 3 injections à 24h d'intervalle Sacrifice 24h après le dernier traitement Doses testées: 25, 50 et 100 mg/kg p.c	Négatif	Shelby et al., 1993	
	Test du micronoyau	Souris ICR mâles (sang périphérique)	5 animaux/groupe Voie intrapéritonéale Doses testées: 10, 20 et 40 mg/kg p.c. Sacrifice 48h ou 72h après le traitement	Positif à 40 mg/kg p.c. à 72h	Liao et al., 2011	
	Test du micronoyau	Souris ICR mâles (sang périphérique)	Chloroacétaldéhyde 5 animaux/groupe Voie intrapéritonéale Doses testées: 0,75, 1,5 et 3 mg/kg p.c. Sacrifice 48h ou 72h après le traitement	Positif à toutes les doses, aux 2 temps	Liao et al., 2011	
	Test de dominance létale	Souris (cellules germinales)		Négatif	Epstein et al., 1972	cité dans NTP 1985
	Test de translocations héréditaires	Souris (cellules germinales)		Négatif	Sheu <i>et al.</i> , 1983	cité dans NTP 1985

5. ANNEXE 5 : ANALYSES BMD CONDUITES SUR LE 2-CE

Données de l'étude Oser et al (1975), rats femelles. effet considéré taux de survie

Dose	decés	NB
0	1	25
30	0	25
45	1	25
67.5	19	25

BMR= 10 %



Fitted models

model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL	BMDU	BMD	conv
null	1	-51.4	104.8	NA	NA	NA	NA	NA
full	4	-22.17	52.34	NA	NA	NA	NA	NA
two.stage	3	-34.48	74.96	no	NA	NA	27.4	yes
log.logist	3	-22.88	51.76	yes	44	62.3	51.6	yes
Weibull	3	-22.88	51.76	yes	44.2	64.2	52.8	yes
log.prob	3	-22.88	51.76	yes	43.9	66.3	50.4	yes
gamma	3	-22.88	51.76	yes	43.9	57.7	50.7	yes
LVM: Expon. m3-	3	-22.94	51.88	yes	44.7	57.1	53.7	yes
LVM: Hill m3-	3	-23.37	52.74	yes	43.3	53.8	49.5	yes

Meilleurs ajustements : Weibull, log.Probit, Gamma

ajustement retenu : Gamma.

BMDU/BMDL = 1,31

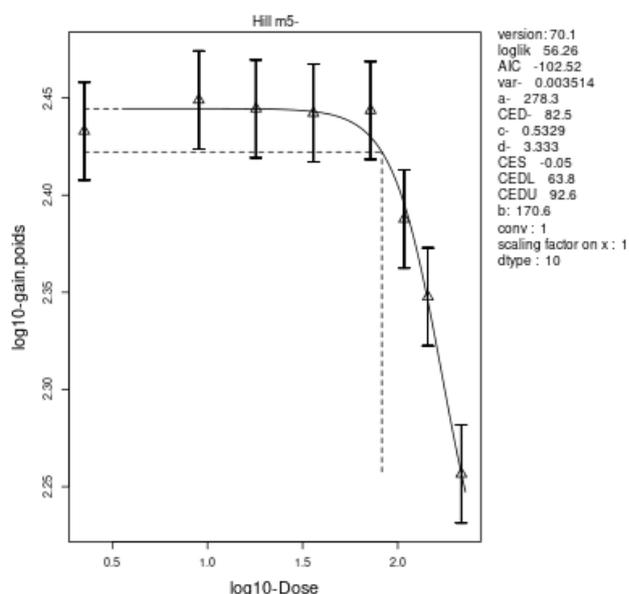
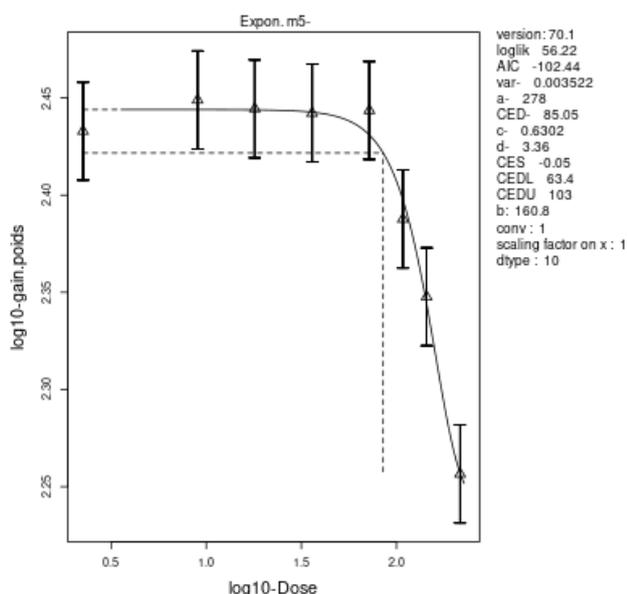
BMDL retenue : 43,9 mg/kg pc/j

Données de l'étude Ambrose (1950), rats exposés pendant 220 jours, effet considéré diminution de gain de poids corporel

Dose	gain-de-poids	SEM	Nb
0	271	1,84	5
9	281,7	7,87	5
18	279	9,18	5
36	277	4,78	5
72	278,6	10,03	5
108	245	9,08	5
144	223	5,36	5
216	181	5,86	5

BMR : 5 %

model	converged	loglik	npar	AIC
full model	1	57.87	9	-97.74
null model	1	17.14	2	-30.28
Expon. m3-	1	54.89	4	-101.78
Expon. m5-	1	56.22	5	-102.44
Hill m3-	1	54.9	4	-101.8
Hill m5-	1	56.26	5	-102.52



Modèle retenu : Hill M5

BMDU/BMDL = 1,45

BMDL retenue : 63,4 mg/kg pc/jour