

Université de Montréal

CARACTÉRISATION DE LA TOXICOCINÉTIQUE
DES TRIHALOMÉTHANES ET DES ACIDES CHLOROACÉTIQUES
ADMINISTRÉS SOUS FORME DE MÉLANGES CHEZ LE RAT

par

Annie St-Pierre

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
pour l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Santé Publique, option toxicologie de l'environnement

Avril 2004

© Annie St-Pierre 2004



WA

5

U58

2004

v.004

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

CARACTÉRISATION DE LA TOXICOCINÉTIQUE
DES TRIHALOMÉTHANES ET DES ACIDES CHLOROACÉTIQUES
ADMINISTRÉS SOUS FORME DE MÉLANGE CHEZ LE RAT

présentée par :

Annie St-Pierre

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Joseph Zayed, Ph.D., président-rapporteur

Robert Tardif, Ph.D., directeur de recherche

Kannan Krishnan, Ph.D., codirecteur

Adolf Vyskocil, Ph.D., membre du jury

Patrick Levallois, M.D., examinateur externe

Thèse acceptée le :

RÉSUMÉ

Au Canada, la chloration de l'eau est le procédé de désinfection le plus utilisé. Toutefois, il entraîne la formation de sous-produits de désinfection toxiques (SPD). Parmi ces SPD, on retrouve notamment les trihalométhanés (THM) et les acides chloroacétiques. Des études toxicologiques ont démontré que les quatre trihalométhanés et deux des acides chloroacétiques possèdent un potentiel cancérigène. Étant donné leur présence commune dans l'eau de consommation, les sous-produits de désinfection peuvent interagir ensemble résultant ainsi en une modification de leur profil toxicocinétique et en une augmentation ou une diminution de leur toxicité. L'objectif général de la recherche était donc de caractériser la toxicocinétique des trihalométhanés et des acides chloroacétiques administrés sous forme de mélange chez le rat.

Dans le premier volet de cette recherche, des mélanges binaires, contenant un THM et un acide chloroacétique, ont été administrés à des rats, par voie intra-veineuse, afin d'évaluer l'influence des acides chloroacétiques sur la cinétique des THM et vice-versa. Les résultats ont démontré que, à doses élevées (0,125 mmol/kg), l'acide trichloroacétique (TCA) augmente la concentration veineuse des quatre THM. À dose similaire, l'acide dichloroacétique (DCA) entraîne une augmentation des concentrations sanguines de dibromochlorométhane (DBCM) et de bromoforme (TBM) tandis que l'acide monochloroacétique (MCA) cause une augmentation des concentrations de bromodichlorométhane (BDCM) et de DBCM. Les THM, en revanche, ne modifient pas la cinétique des acides chloroacétiques (TCA et DCA). Des mélanges plus complexes, contenant plusieurs THM avec ou sans un acide chloroacétique, ont ensuite été administrés afin de vérifier l'influence des THM sur leur propre cinétique. On a remarqué que, en mélange, les THM ont pour effet de modifier leur propre cinétique (inhibition réciproque) sans toutefois modifier la cinétique du TCA ou du DCA.

Le second volet de la recherche consistait à caractériser, sous des conditions *in vitro*, la nature des interactions entre les THM et les acides

chloroacétiques observées en milieu *in vivo*. L'approche consistait à évaluer la cinétique *in vitro* des THM seuls et en mélanges afin de vérifier si la présence d'un acide chloroacétique ou encore des trois autres THM avait pour effet d'inhiber la biotransformation des THM. Les résultats ont démontré une inhibition réciproque entre les THM lorsqu'ils se retrouvent en mélanges binaires et quaternaires. De plus, on a observé que le TCA a pour effet d'inhiber le métabolisme des quatre THM tandis que le DCA et le MCA n'ont aucune influence sur la cinétique *in vitro* des THM. L'approche Lineweaver-Burk a permis d'identifier que le TCA inhibe la biotransformation du chloroforme par un mécanisme compétitif alors que l'inhibition pour le DBCM et le TBM est de type non-compétitif. L'identification du mécanisme entre le TCA et le DBCM était moins évidente. Une inhibition non-compétitive a été supposée en raison de la structure chimique du DBCM, similaire aux deux autres THM bromés.

Le troisième volet de la recherche consistait à développer un modèle toxicocinétique à base physiologique chez le rat exposé, par voie intra-veineuse, aux THM, seuls et en mélanges. Pour ce faire, un compartiment a été ajouté au modèle de Da Silva et collaborateurs (1999) afin de décrire le comportement du véhicule utilisé (Alkamuls[®]) dans les études *in vivo*. L'analyse des coefficients de partage des THM dans le véhicule a laissé supposer la possibilité d'une certaine rétention des THM dans l'Alkamuls[®] suite à une administration intra-veineuse. Les modèles développés ont ainsi pu prédire adéquatement la cinétique des THM observée dans les études *in vivo*. Pour la modélisation du mélange de THM, on a inter-connecté les quatre modèles individuels au niveau du foie par un terme décrivant l'inhibition compétitive. Une approche simplifiée a également permis de modéliser l'impact causé par le TCA sur les THM.

Enfin, l'ensemble des méthodologies développées et des résultats obtenus au cours de cette recherche ont permis une analyse de risque basée sur la concentration tissulaire et considérant les interactions entre les THM lorsqu'ils se retrouvent en mélanges. Cette recherche a permis de mettre en

évidence des interactions entre les THM et les acides chloroacétiques et a démontré l'utilité de la modélisation toxicocinétique à base physiologique dans l'analyse de risque pour les mélanges.

Mots clés : trihalométhanes, acides chloroacétiques, toxicocinétique, mélange, sous-produits de désinfection, eau potable

SUMMARY

Chlorination has been the most widely used disinfection process for drinking water in Canada. Unfortunately, the reaction of chlorine with naturally-occurring organic matter in water (e.g., fulvic and humic acids) results in the formation of by-products. The major, identifiable, disinfection by-products (DBPs) are trihalomethanes (THMs) and chloroacetic acids. Toxicological studies have demonstrated that the four THMs and two of the chloroacetic acids induce cancer in rodents. Due to their co-occurrence in drinking water, DBPs may interact with each other resulting in a modification of their toxicokinetic and an increase or a decrease in their toxicity. The objective of this thesis was to characterize the toxicokinetic of the trihalomethanes and chloroacetic acid when administered in mixtures to the rat.

The first part of the research project consisted in administering to the rat, by intravenous injection, binary mixtures, containing one THM and one chloroacetic acid, in order to evaluate the influence of chloroacetic acids on the toxicokinetic of trihalomethanes and vice-versa. Results demonstrated that a high dose of trichloroacetic acid (TCA) (0.125 mmol/kg) increased the blood concentrations of the four THMs. At a similar dose, dichloroacetic acid (DCA) increased the blood concentrations of dibromochloromethane (DBCM) and bromoform (TBM) while monochloroacetic acid (MCA) increased the blood concentrations of bromodichloromethane (BDCM and DBCM. In contrast, the kinetics of TCA and DCA was not influenced by any of the THMs. Complex mixtures, containing the four THMs with or without a chloroacetic acid, were also administered in order to evaluate the influence of THMs on their respective kinetics. It was observed that, as a mixture, THMs interact between each other without affecting the kinetic of TCA or DCA.

The second part of the research project consisted in investigating the nature of the mechanism behind the toxicokinetic interaction between THMs and chloroacetic acids observed in previous *in vivo* experiments. More precisely,

the *in vitro* metabolism of THMs, singly or as a mixture, was evaluated in order to verify if the presence of a chloroacetic acid inhibited the biotransformation of THMs. Results indicated a mutual kinetic interaction between THMs when present as binary or quaternary mixtures. Whereas DCA and MCA had no influence on THMs, TCA caused an important inhibition of the metabolism of all THMs. A Lineweaver-Burk analysis revealed that TCA inhibited CHCl_3 by a competitive mechanism while it inhibited BDCM and TBM by a non-competitive mechanism. As for DBCM, results suggested a more complex pattern of inhibition.

The third part of the research project consisted in developing physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models for individual as well as mixtures of THMs following their intravenous administration using Alkamuls[®] as the vehicle. Based on the observations from the *in vivo* experiments and the results obtained from the Alkamuls[®]:air partition coefficients for THMs, a slow, steady release of THMs from an Alkamuls[®] compartment to the venous blood compartment was hypothesized. The individual PBPK models describing a limited uptake of THMs into venous blood adequately simulated the blood concentrations in rats after single intravenous administrations of the four THMs. For modeling of the quaternary mixture of THMs, the four individual models were interconnected via an interaction term describing competitive inhibition. A simplified approach permitted the simulation of the influence that TCA has on THMs.

Finally, all the results obtained during the course of this thesis enabled a risk analysis based on the tissue concentration and thus considering the interactions between THMs as a mixture. This thesis characterized the interactions between THMs and chloroacetic acids and demonstrated the utility of PBPK modelling in risk analysis.

Key words: trihalomethanes, chloroacetic acids, toxicokinetic, mixtures, disinfection by-products, drinking water.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	I
IDENTIFICATION DU JURY	II
RÉSUMÉ	III
SUMMARY.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
INDEX DES TABLEAUX.....	XIII
INDEX DES FIGURES	XVII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XXI
REMERCIEMENTS	XXIII
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
1.1. La désinfection de l'eau	2
1.1.1. Le chlore.....	2
1.1.2. Les autres désinfectants de l'eau	3
1.1.3. Les sous-produits de désinfection.....	4
1.2. Les trihalométhanes.....	5
1.2.1. Propriétés physico-chimiques	5
1.2.2. Sources d'exposition	6
1.2.3. Toxicocinétique.....	8
1.2.3.1. Absorption	8
1.2.3.2. Distribution	8
1.2.3.3. Métabolisme.....	9
1.2.3.4. Élimination	11
1.2.4. Impact sur la santé.....	11
1.2.4.1. Les études toxicologiques	11
1.2.4.2. Les études épidémiologiques	23
1.2.4.2.1. Le cancer	23
1.2.4.2.2. La reproduction	30
1.2.5. Les recommandations des niveaux d'exposition admissibles	33
1.3. Les acides chloroacétiques	34
1.3.1. Propriétés physico-chimiques	34

1.3.2. Sources d'exposition	34
1.3.3. Toxicocinétique.....	35
1.3.3.1. Absorption	35
1.3.3.2. Distribution	36
1.3.3.3. Métabolisme.....	36
1.3.3.4. Élimination	41
1.3.4. Impact sur la santé.....	41
1.3.4.1. Les études toxicologiques	41
1.3.4.2. Les études épidémiologiques	47
1.3.5. Les recommandations des niveaux d'exposition admissible	47
1.4. Les interactions.....	48
1.4.1. Mécanisme d'action	48
1.4.1.1. Phase cinétique	48
1.4.1.1.1. Induction enzymatique	48
1.4.1.1.2. Inhibition métabolique.....	49
1.4.1.2. Phase dynamique	50
1.4.2. Résultats des effets.....	50
1.4.3. Les études sur les interactions	50
1.5. La modélisation.....	52
1.5.1. La modélisation toxicocinétique à base physiologique.....	52
1.5.2. Les modèles TCBP publiés pour les trihalométhanes	55
1.5.3. Les modèles TCBP publiés pour les acides chloroacétiques	60
1.6. L'analyse du risque	63
1.6.1. L'approche actuelle pour les mélanges.....	63
1.6.2. Une nouvelle approche considérant les interactions toxicocinétiques.....	65
 2. LE PROJET DE RECHERCHE	 68
2.1. La problématique	68
2.2. Objectifs de la recherche	69
2.3. Organisation de la thèse	69

3. ÉVALUATION *IN VIVO* DES INTERACTIONS TOXICOCINÉTIQUES
ENTRE LES TRIHALOMÉTHANES ET LES ACIDES
CHLOROACÉTIQUES. 72

ARTICLE I: Evaluation of the influence of chloroacetic acids on the
pharmacokinetics of trihalomethanes in the rat 74

Abstract75

Introduction76

Chemicals78

Animals78

Dosing procedure78

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of individual THMs79

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of THMs in mixtures.....79

Analysis of THMs in blood79

Data analysis80

Results81

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of individual THMs81

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of THMs in mixtures.....82

Discussion83

Acknowledgements86

References87

Figure legends93

ARTICLE II: Evaluation of the influence of trihalomethanes on the
pharmacokinetics of chloroacetic acids in the rat101

Abstract102

Introduction103

Materials and Methods.....104

Chemicals104

Treatment.....104

Analysis of chloroacetic acids in blood.....104

Data analysis105

Results106

Discussion	107
Acknowledgements	108
References	109
Figure legends	111
4. CARACTÉRISATION <i>IN VITRO</i> DES INTERACTIONS MÉTABOLIQUES ENTRE LES TRIHALOMÉTHANES ET LES ACIDES CHLOROACÉTIQUES.	115
ARTICLE III: Characterization of the metabolic interaction between trihalomethanes and chloroacetic acids using rat liver microsomes.....	117
Abstract	118
Introduction	119
Materials and Methods	122
Chemicals	122
Microsomes	122
Metabolism analysis	122
Kinetic analysis	123
Results	125
Discussion	127
Acknowledgements	129
References	130
Figure legends	138
5. DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE PHARMACOCINÉTIQUE À BASE PHYSIOLOGIQUE (PBPK) CONSIDÉRENT LES INTERACTIONS TOXICINÉTIQUES.....	143
ARTICLE IV: Physiological modeling of the toxicokinetics of trihalomethanes in mixtures	145
Abstract	146
Introduction	147
Materials and Methods	150

Chemical	150
Partition coefficients in Alkamuls [®]	150
Model development.....	151
Model simulation.....	152
Results	153
Discussion	155
Acknowledgements	157
References	158
Figure legends	165
Appendix A	170
6. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	183
7. BIBLIOGRAPHIE	196

INDEX DES TABLEAUX

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tableau 1. Principaux sous-produits halogénés résultant de la chloration de l'eau.....	5
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des trihalométhanes.	6
Tableau 3. Les principales études chroniques ayant porté sur les trihalométhanes.	17
Tableau 4. Les principales études subchroniques ayant porté sur les trihalométhanes.	19
Tableau 5. Les principales études aiguës et subaiguës ayant porté sur les trihalométhanes.....	20
Tableau 6. Les principales études sur le cancer de la vessie et l'exposition aux trihalométhanes.	27
Tableau 7. Les principales études sur le cancer du côlon et/ou du rectum et l'exposition aux trihalométhanes.	28
Tableau 8. Les principales études sur le cancer (autre que le cancer de la vessie ou le cancer colorectal) et l'exposition aux trihalométhanes.	29
Tableau 9. Les principales études épidémiologiques concernant l'exposition aux trihalométhanes et les effets néfastes sur la reproduction.....	31

Tableau 10. Propriétés physico-chimiques des acides chloroacétiques.	34
Tableau 11. Principales études chroniques ayant porté sur les acides chloroacétiques.....	44
Tableau 12. Principales études subchroniques ayant porté sur les acides chloroacétiques.....	45
Tableau 13. Principales études aiguës et subaiguës ayant porté sur les acides chloroacétiques.	46
Tableau 14. Représentation mathématique de la modification de la vitesse maximale du métabolisme (V_{max}) et de la constante d'affinité de Michaëlis-Menten (K_m) lors d'une inhibition métabolique	55
Tableau 15. Principaux modèles TCBP développés pour les trihalométhanes.	58
Tableau 16. Principaux modèles TCBP développés pour les acides chloroacétiques.	62
CHAPITRE 3. ARTICLE I.	
Table 1. Maximum concentration (C_{max} - μM) and area under the blood concentration <i>versus</i> time curves (AUC - $\mu M \cdot hr$) of trihalomethanes administered alone or in combination with chloroacetic acids.....	91
Table 2. Maximum concentration (C_{max} - μM) and area under the blood concentration <i>versus</i> time curves (AUC - $\mu M \cdot h$) for the four trihalomethanes administered alone or as a mixture with or without a chloroacetic acid.....	92

CHAPITRE 4. ARTICLE III.

Table 1. Percentage of inhibition (measured after 40 minutes of incubation at 37°C) for every THM in various mixture scenarios.....136

Table 2. The kinetic parameter values (i.e. Michaëlis constant, K_m and maximum velocity, V_{max}) for the four THMs (9 - 140 ppm) in the absence and presence of the inhibitor TCA (12.2 mmol/L).....137

CHAPITRE 5. ARTICLE IV.

Table 1. Blood:air ($P_{b:a}$), Alkamuls®:air ($P_{e:a}$) and Alkamuls®:blood ($P_{e:b}$) partition coefficients for the four THMs.....162

Table 2. Zero order constants and metabolic rate constants (K_m and V_{max}) estimated in the PBPK model for the four THMs.....163

Table 3. Metabolic inhibition constants (K_i) estimated for all the binary interactions between THMs.164

CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Tableau 1. Surface sous la courbe et quantité métabolisée dans l'organe cible pour les quatre THM, seuls et en mélange, lors d'une exposition aux concentrations maximales acceptables de l'OMS.....188

Tableau 2. Le potentiel cancérigène des trois trihalométhanes bromés basé sur deux différentes mesures (SSC et Q_{met}) de l'exposition tissulaire (q^*_{ti}).190

Tableau 3. Niveau de risque (R) pour un mélange de THM bromés estimé selon l'approche conventionnelle et la nouvelle approche basée sur l'exposition tissulaire.....191

Tableau 4. Surface sous la courbe lors d'une exposition à la dose de référence et indice biologique de danger des THM, seuls et en mélange.....	193
--	-----

INDEX DES FIGURES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1. Étapes dans le métabolisme d'un trihalométhane.....10

Figure 2. Étapes dans le métabolisme de l'acide trichloroacétique37

Figure 3. Étapes dans le métabolisme de l'acide dichloroacétique.....39

Figure 4. Étapes dans le métabolisme de l'acide monochloroacétique40

Figure 5. Représentation conceptuelle d'un modèle TCBP pour les trihalométhanes administrés par voie orale54

CHAPITRE 3. ARTICLE I.

Figure 1. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of trichloroacetic acid.....95

Figure 2. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of dichloroacetic acid96

Figure 3. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of monochloroacetic acid.....97

Figure 4. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.03125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs plus 0.125 mmol/kg (i.v.) of trichloroacetic acid.....98

Figure 5. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.03125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs plus 0.125 mmol/kg (i.v.) of dichloroacetic acid.....99

CHAPITRE 3. ARTICLE II.

Figure 1. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of trichloroacetic acid in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of this chemical alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of (A) chloroform, (B) bromodichloromethane, (C) dibromochloromethane or (D) bromoform112

Figure 2. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of dichloroacetic acid in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of this chemical alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of (A) chloroform, (B) bromodichloromethane, (C) dibromochloromethane or (D) bromoform.....113

Figure 3. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) TCA and (B) DCA in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with a mixture containing 0.03125 mmol/kg (i.v.) of each of the four THMs.....114

CHAPITRE 4. ARTICLE III.

Figure 1. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl₃), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in the presence of TCA with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.139

Figure 2. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl₃), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in the presence of a quaternary mixture containing all 4 trihalomethanes (THMs) with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.....140

Figure 3. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl₃), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in the presence of 4-methylpyrazole (4-MP) with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.141

Figure 4. Lineweaver-Burk plot of (A) chloroform (CHCl₃), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) alone and in the presence of TCA with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.....142

CHAPITRE 5. ARTICLE IV.

- Figure 1.** Conceptual representation of the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for intravenous administrations of individual THMs.166
- Figure 2.** Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following single intravenous administrations of 0.03125 mmol/kg or 0.125 mmol/kg of each THM.....167
- Figure 3.** Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following intravenous administrations of either 0.03125 mmol/kg of each THM or a quaternary mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs168
- Figure 4.** Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following intravenous administrations of either 0.125 mmol/kg of each THM or a binary mixture containing 0.125 mmol/kg of TCA and 0.125 mmol/kg of a THM.....169

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Description
α	Facteur de modification d'un paramètre
3-MC	3-méthylcholanthrène
ACA	Acides chloroacétiques
AHA	Acides haloacétiques
ALAT	Alanine amino transférase
ALKP	Alcaline phosphatase
ASAT	Aspartate amino transférase
BDCM	Bromodichlorométhane
BTHM	Trihalométhanés bromés
BUN	Azote uréique sanguin
C _i	Concentration d'exposition
CMA	Concentration maximale acceptable
COT	Carbone organique total
CT	Concentration tissulaire (mg/L)
CV	Concentration veineuse
C _{vf}	Concentration veineuse au foie (mg/L)
D	Dose (mg/kg/jour)
DBCM	Dibromochlorométhane
DCA	Acide dichloroacétique
DDT	1,1,1,-trichloro-2-2-bis(p-chlorophenyl)éthane
ds	Dans
HAN	Haloacétonotriles
IBD	Index biologique de danger
I.C.	Intervalle de confiance
ID	Index de danger
i.v.	Intra-veineux (se)
K _i	Constante d'inhibition (mg/L)
K _m	Constante d'affinité de Michaëlis-Menten (mg/L)
K _p	Coefficient de perméabilité

LD ₅₀	Dose entraînant la mort de 50% des organismes exposés
LDH	Lactico-déshydrogénase
LOAEL	Lowest observed adverse effect level
MCA	Acide monochloroacétique
M.O.	Matière organique
NCI	Institut national du cancer des États-Unis
NOEL	No observed effect level
NTP	Programme national de toxicologie des États-Unis
OR	Rapport des cotes
OTZ	Acide 2 oxothiazolidine-4-carboxilique
PCN	Pregnelone-16 α -carbonitrile
P(d)	Risque cancérigène
Q	Débit sanguin
Q _{alv}	Débit pulmonaire
q*	Risque unitaire
Qté	Quantité
r	Risque
RfD	Dose de référence
RR	Risque relatif
SDH	Sorbitol-déshydrogénase
SNC	Système nerveux central
SPD	Sous-produits de désinfection
TBM	Bromoforme
TCA	Acide trichloroacétique
TCBP	Toxicocinétique à base physiologique
TCE	Trichloroéthylène
TEF	Facteur d'équivalence toxique
THM	Trihalométhanes
TTHM	Trihalométhanes totaux
VEMP	Valeur d'exposition moyenne pondérée
V _{max}	Vélocité maximale du métabolisme (mg/h)

REMERCIEMENTS

Je tiens grandement à remercier mon directeur de recherche Robert Tardif pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet. Je vous remercie Robert pour m'avoir permis de pousser les limites de ma curiosité scientifique. Merci pour vos connaissances, vos conseils et vos encouragements. J'ai énormément apprécié vous avoir comme directeur et j'ai aussi apprécié la grande disponibilité que vous avez envers tous vos étudiants.

Je tiens également à remercier mon codirecteur Kannan Khrishnan pour ses connaissances scientifiques, son temps et son oeil critique. Je souhaite à tous mes collègues la chance de vous avoir comme professeur Kannan, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je tiens à remercier Mme Ginette Charest-Tardif et Mlle Mylène Beaudoin pour leur aide et leur EXCELLENT appui technique. Ginette, merci pour ton organisation. Mylène, merci pour ta débrouillardise et pour les 1001 petites faveurs que je t'ai demandées tout au long de ma rédaction de thèse, tu m'as sauvé beaucoup de temps.

J'aimerais remercier mon ami M. Jérôme Lavoué pour ses conseils, son écoute, son support et surtout ses encouragements. Merci d'être la formidable personne que tu es Jérôme.

Finalement, j'aimerais remercier les deux amours de ma vie : ma mère, Mme Rachel St-Pierre et mon conjoint, M. Stephan Cornellier, pour m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles de mes études. Maman, tu es mon inspiration, ma force, ma détermination et ma fierté. Stephan, merci de me faire rire quotidiennement, tu me rends la femme la plus heureuse! ☺

CHAPITRE UN

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. La désinfection de l'eau

La désinfection de l'eau constitue l'une des mesures les plus simples et les plus significatives qui aient été prises dans le domaine de la santé publique au cours du 20^{ième} siècle. Elle a entraîné une réduction massive de l'incidence des maladies d'origine hydrique telles que la fièvre typhoïde et le choléra. Plus précisément, la désinfection réduit ou élimine la présence de microorganismes dans l'eau, tels les bactéries, les virus et les protozoaires, susceptibles de causer des maladies et même la mort. Le chlore, les chloramines, le dioxyde de chlore, l'ozone et l'iode sont les substances les plus fréquemment utilisées dans le processus de désinfection de l'eau (Richardson *et al.*, 1999; WHO, 2002a). Les radiations ultraviolettes peuvent également être utilisées pour désinfecter l'eau. Cependant, tous ces désinfectants comportent certains désavantages quant à leur utilisation. La plupart entraînent la formation de sous-produits de désinfection (SPD) pouvant être néfastes pour la santé.

1.1.1. Le chlore

Au Canada, la chloration est la méthode de désinfection de l'eau la plus répandue. Elle est généralement associée à d'autres processus de traitement tels la coagulation, la sédimentation et la filtration de l'eau. Cette méthode est préférée dans plusieurs pays puisqu'elle s'avère peu coûteuse, simple, efficace, et peut facilement être appliquée aux petits systèmes de traitement d'eau (Neutra *et al.*, 1992). Le chlore persiste longtemps dans l'eau en tant que chlore résiduel, minimisant ainsi la possibilité de recontamination par les microbes entre l'usine de traitement d'eau et le robinet (WHO, 2002b). Il est efficace pour une eau ayant une faible turbidité et un pH inférieur à 8.0. Cependant, dans les années 70, des études ont démontré que, lorsque le chlore entre en contact avec la matière organique, il y a formation de sous-produits halogénés pouvant être néfastes pour la santé. Plus précisément, il se produit une réaction chimique entre le chlore

et les acides humiques et fulviques. Ces derniers sont des dérivés issus de la décomposition de la matière organique associés à la présence de végétation dans les sources d'approvisionnement en eau. Les concentrations les plus élevées de SPD se retrouvent généralement dans l'eau chlorée provenant des eaux de surface, comme les rivières et les lacs, puisqu'elles ont une forte teneur en matière organique. Le traitement des eaux souterraines produit peu de SPD (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000).

Dans les années 70, plusieurs études épidémiologiques de type écologique ont rapporté des associations entre la chloration de l'eau et des excès de cancer dans certaines régions des États-Unis. En 1976, l'Institut National du Cancer (NCI) des États-Unis a démontré que le chloroforme, issu de la chloration de l'eau, est cancérigène chez les rongeurs (NCI, 1976). Depuis ce temps, une inquiétude s'est manifestée dans la population à savoir si l'exposition aux sous-produits de la désinfection pouvaient entraîner un certain risque cancérigène chez l'humain.

1.1.2. Les autres désinfectants de l'eau

Les **chloramines** entraînent des concentrations de sous-produits halogénés plus faibles que le chlore. Toutefois, des quantités significatives de nitrites, de nitrates et de matière organique chlorée peuvent être formées suite à l'utilisation de ce mode de désinfection (Haley, 1999; Boorman *et al.*, 1999). Ces substances peuvent être très néfastes pour la santé des individus. De plus, les chloramines ont une efficacité moindre pour assurer un niveau de désinfection adéquat dans le système de distribution d'eau.

Le **dioxyde de chlore** est plus dispendieux que le chlore et peu efficace en ce qui a trait à l'élimination des agents viraux. Il est cependant plus efficace que le chlore en ce qui concerne l'inactivation des parasites. Il entraîne la formation de composés inorganiques comme les chlorites et les chlorates. Peu d'information est disponible quant à la toxicité des ces produits. Le dioxyde de chlore est un composé instable, il est surtout utilisé dans le

contrôle des propriétés organoleptiques de l'eau de consommation (WHO, 2002a).

L'**ozone** est un gaz instable peu soluble dans l'eau. C'est un désinfectant très efficace en ce qui a trait à l'élimination de micro-organismes pathogènes. Il ne forme pas de sous-produits halogénés mais entraîne cependant la formation de sous-produits inorganiques tels que les bromates. De plus, il n'assure aucune désinfection résiduelle. Il nécessite généralement l'ajout d'un deuxième désinfectant tel que le chlore afin d'assurer l'efficacité de la désinfection jusqu'au robinet (Boorman *et al.*, 1999). Cet ajout a pour effet d'entraîner la formation de sous-produits tels que les aldéhydes.

L'**iode** est généralement utilisé pour désinfecter de petites quantités d'eau et s'applique très difficilement aux grands systèmes de traitement d'eau. Chez certains individus, il peut engendrer une réaction allergique. De plus, l'eau désinfectée par ce composé possède souvent un goût désagréable (WHO, 2002a).

Les **radiations ultraviolettes** sont surtout utilisées dans les petites communautés. Elles nécessitent un équipement très dispendieux et une eau claire. Plus la contamination est importante, moins les radiations sont efficaces (WHO, 2002a).

1.1.3. Les sous-produits de désinfection

Le tableau 1 présente les principaux sous-produits halogénés résultant de la chloration de l'eau. Les quatre familles de composés les plus importantes sont les trihalométhanes (THM), les acides haloacétiques (AHA), les haloacétonitriles (HAN) et les halocétones (Boorman *et al.*, 1999; Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). Les facteurs qui influencent la formation de SPD sont la concentration de chlore, le pH, la température, la concentration des acides humiques et fulviques, le temps de contact et la concentration de brome. Cette dernière favorise la formation de SPD bromés. Plus la

température ou la concentration de carbone organique total (COT) augmente, plus on retrouve de SPD dans l'eau. En outre, un milieu alcalin favorise la formation de THM. Une étude récente a démontré qu'une augmentation du pH de 6 à 8 favorise la formation de THM mais diminue la formation d'acide trichloroacétique sans toutefois influencer la formation d'acide dichloroacétique (Liang et Singer, 2003).

Tableau 1. Principaux sous-produits halogénés résultant de la chloration de l'eau*.

Sous-produits	Concentration médiane (µg/L)	Concentration maximale (µg/L)
TRIHALOMÉTHANES		
Chloroforme	25	240
Bromodichlorométhane	9,5	90
Dibromochlorométhane	1,6	36
Bromoforme	<0,2	7,1
ACIDES HALOACÉTIQUES		
Acide dichloroacétique	15	74
Acide trichloroacétique	11	85
Acide bromochloroacétique	3,2	49
Acide monochloroacétique	1,3	5,8
Acide dibromoacétique	<0,5	7,4
Acide monobromoacétique	<0,5	1,7
HALOACÉTONITRILES		
Dichloroacétonitrile	2,1	10
Bromoacétonitrile	0,7	4,6
Bromochloroacétonitrile	0,6	1,1
Dibromoacétonitrile	<0,5	9,4
Trichloroacétonitrile	<0,02	0,02
HALOCÉTONES		
1,1,1-Trichloropropanone	1,0	8,3
1,1-Dichloropropanone	0,4	2,5
AUTRES		
Chlorate	161	9180
Hydrate de chloral	2,1	25

*(Boorman *et al.*, 1999). Concentrations mesurées aux États-Unis pouvant varier selon le produit, le temps et la source d'échantillonnage.

1.2. Les trihalométhanes

1.2.1. Propriétés physico-chimiques

Les THM sont des composés organiques volatils contenant un atome de carbone, un atome d'hydrogène et trois atomes d'halogènes, soit le chlore, le

brome ou l'iode. À température ambiante, les THM se retrouvent sous la forme liquide. Ils sont peu solubles dans l'eau et sont très sensibles à la lumière. Le tableau 2 présente les principales propriétés physico-chimiques des quatre THM les plus fréquemment retrouvés dans l'eau potable.

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des trihalométhanés.

Propriétés physico-chimiques	Chloroforme	BDCM	DBCM	Bromoforme
Formule moléculaire	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃
Poids moléculaire (g/mole)	119,39	163,83	208,29	252,77
Densité (à 20°C) (mg/L)	1,484	1,98	2,451	2,9035
Point d'ébullition (°C)	61-62	87	119-120	149-150
Point de fusion (°C)	-61,5	-55	-22	7,5

Adapté de Merck, 1989 et d'Aldrich, 1996.

1.2.2. Sources d'exposition

L'eau potable est la source d'exposition la plus importante en ce qui a trait aux trihalométhanés. Au Canada, la concentration annuelle moyenne des THM totaux est habituellement inférieure à 60 µg/L. Cette valeur représente la somme des concentrations des quatre THM soit une moyenne annuelle de 50 µg/L de CHCl₃, 10 µg/L de BDCM et DBCM et 0,1 µg/L de TBM (Santé Canada, 1993). Lors d'une étude réalisée en 1993 dans 35 municipalités canadiennes utilisant uniquement le chlore comme désinfectant, on a montré que les concentrations moyennes de THM totaux variaient de 16,8 à 33,4 µg/L en hiver et de 33,5 à 62,5 µg/L en été, avec une concentration maximale de 342,4 µg/L mesurée à un site en particulier durant l'été (Williams *et al.*, 1997). En 2000, la ville de Montréal a rapporté une concentration maximale de 38 µg/L pour les trihalométhanés totaux (Ville de Montréal, 2001). On retrouve également des THM dans les boissons fabriquées avec de l'eau traitée. Une étude américaine sur les boissons gazeuses a montré que les concentrations se situaient entre 3,2 µg/L et 44,8 µg/L pour les THM totaux (Abdel-Rahman, 1982). Autrefois, le chloroforme était présent dans certains dentifrices, onguents, et sirops contre la toux. Son utilisation dans la fabrication de ces produits est

maintenant interdite en vertu de la Loi sur les produits dangereux (Santé Canada, 1993). Il a également longtemps été utilisé comme produit anesthésique avant la découverte de ses nombreux effets toxiques.

L'exposition aux THM par voie dermale et respiratoire peut être également très importante compte tenu de leur caractère volatil et lipophile. La prise d'un bain ou d'une douche, la baignade en piscine, le lavage de la vaisselle sont toutes des activités exposant les individus aux THM par voie dermique et par inhalation (Backer *et al.*, 2000). Une première étude a démontré qu'une douche de 10 minutes peut entraîner une exposition au chloroforme plus importante que celle par ingestion de 2 L/jour (Jo *et al.*, 1990). Les auteurs ont mesuré une concentration moyenne de 27,4 µg/L dans l'eau comparativement à une concentration moyenne de 186 µg/m³ dans l'air de la douche. Plusieurs auteurs ont évalué l'exposition aux THM par inhalation et par la peau suite à la baignade en piscines intérieures. On a démontré que la proportion de THM retrouvé dans le sang et dans l'urine est directement reliée aux concentrations de ces composés retrouvées dans l'eau de la piscine et dans l'air ambiant autour de cette piscine (Aggazzotti *et al.*, 1990; Cammann *et al.*, 1995). Une étude québécoise a mesuré des concentrations de THM variant entre 18 et 80 µg/L dans l'eau de piscine et variant entre 78 µg/m³ et 329 µg/m³ dans l'air ambiant autour de ces piscines (Lévesque *et al.*, 2000). Des concentrations similaires de THM ont été observées dans l'eau de piscines intérieures en Italie, soit entre 17,8 et 70,8 µg/L. Cependant, les concentrations de THM dans l'air ambiant étaient nettement inférieures, c'est-à-dire en moyenne 58 µg/m³ (Fantuzzi *et al.*, 2001). Dans les deux cas, on a mesuré les concentrations de THM dans l'air alvéolaire des usagers et/ou employés de piscines. Les valeurs obtenues étaient fortement corrélées aux concentrations de THM retrouvées dans l'eau et l'air ambiant des piscines.

1.2.3. Toxicocinétique

1.2.3.1. Absorption

Compte tenu de leur caractère volatil et lipophile, les trihalométhanes pénètrent facilement les membranes biologiques et sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal, des muqueuses respiratoires et de la peau.

Lors d'une administration des THM par gavage, plusieurs études ont démontré que le véhicule utilisé joue un rôle important dans l'absorption des THM. Les concentrations maximales dans le sang sont plus élevées lorsque les composés sont administrés dans un véhicule aqueux comparativement à un véhicule huileux (Withey *et al.*, 1983; Lilly *et al.*, 1994; Dix *et al.*, 1997).

Le coefficient de perméabilité (K_p) est le paramètre le plus fréquemment utilisé pour estimer l'absorption par la peau. Xu et collaborateurs (2002) ont mesuré ce paramètre et ont démontré que l'absorption par la peau était une voie d'exposition importante pour les trihalométhanes. Leurs valeurs de K_p se situaient entre 0,16 et 0,21 cm/h pour les THM, le bromoforme étant le plus facilement absorbé.

1.2.3.2. Distribution

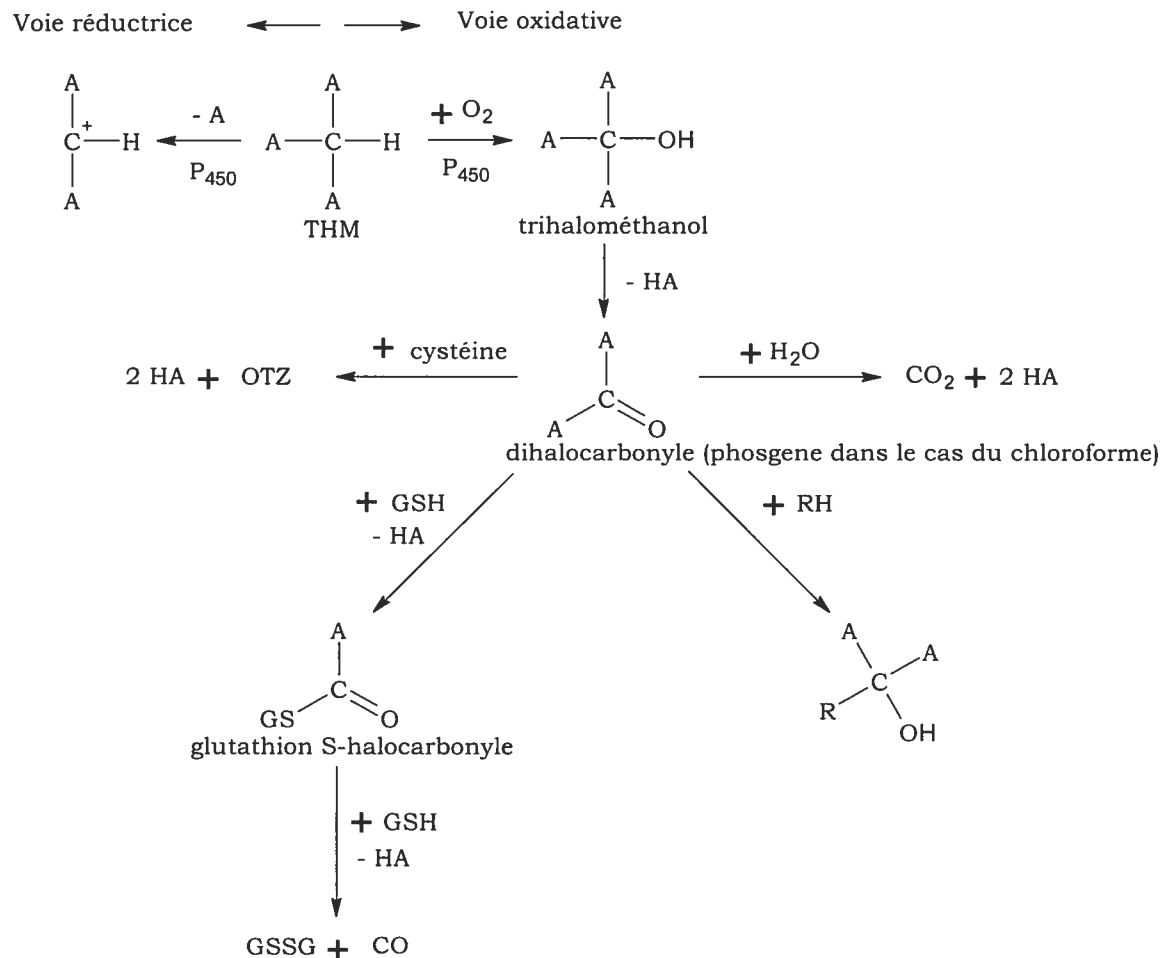
Les THM se distribuent principalement dans le gras étant donné leur grande lipophilicité. Les coefficients de partage gras:air pour le chloroforme, le BDCM, le DBCM et le TBM sont respectivement de 203, 526, 1917 et 4129 (Gargas *et al.*, 1989; Lilly *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 1999). De plus, chez les rongeurs, on a démontré que les THM se distribuent au niveau du foie, des reins et du sang. Plusieurs études ont démontré que les trihalométhanes sont capables de se lier aux protéines plasmatiques telles que l'albumine et l'hémoglobine. Le chloroforme, par exemple, se lie à l'albumine de façon réversible et saturable (Johansson, 1997; Patra *et al.*, 1997). Lors d'administration par gavage, on peut également retrouver une

grande proportion de THM au niveau de l'estomac (Mink *et al.*, 1986). Une étude sur le chloroforme a démontré que ce composé se distribue également dans le cerveau (Vogt *et al.*, 1980).

1.2.3.3. Métabolisme

Les trihalométhanés sont principalement métabolisés au niveau du foie mais peuvent également être métabolisés au niveau des reins et des poumons (Anders *et al.*, 1978; Kluwe *et al.*, 1978; Löfberg *et al.*, 1986). Plus précisément, ils sont métabolisés au niveau des microsomes. La figure 1 présente les différentes étapes dans le métabolisme des THM. Premièrement, les enzymes oxydases à fonction mixte, dépendantes du cytochrome P450, insèrent un oxygène au niveau de la liaison C-H du trihalométhane pour produire un trihalométhanol, un composé très instable qui se décompose rapidement en dihalocarbonyle. Ce dernier peut soit être hydrolysé en dioxyde de carbone, soit interagir avec la cystéine et former l'acide 2 oxothiazolidine-4-carboxylique (OTZ) ou soit être attaqué par le glutathion et former un composé glutathion S-halocarbonyle. Suite à une deuxième attaque du glutathion, le glutathion S-halocarbonyl se transforme en monoxyde de carbone et en glutathion disulfide (Anders *et al.*, 1978; Stevens *et al.*, 1979; Ahmed *et al.*, 1980). En absence d'oxygène, les THM se transforment en radicaux libres de type dihalométhylcarbènes. Chez les rongeurs, plus de 60% d'une dose de chloroforme peut être convertie en CO₂ (Brown *et al.*, 1974). Pour le chloroforme, la voie oxydative génère du trichlorométhanol qui se décompose spontanément en phosgène (ou dichlorocarbonyle), un métabolite réactif et toxique (Pohl *et al.*, 1977). Le phosgène peut se lier de façon covalente aux composantes nucléophiles des protéines tissulaires et est considéré responsable de la toxicité du chloroforme (Pohl *et al.*, 1980). La voie réductrice du chloroforme entraîne la formation de dichlorométhylcarbènes (Testai *et al.*, 1984; Tomasi *et al.*, 1985). Ces composés peuvent également se lier aux protéines tissulaires et engendrer une certaine toxicité (Testai *et al.*, 1990). Le BDCM est métabolisé en intermédiaires réactifs plus rapidement que le chloroforme (Lilly *et al.*, 1997a).

Figure 1. Étapes dans le métabolisme d'un trihalométhane (Adaptée de Stevens et Anders, 1979, NTP, 1989, Tomasi *et al.*, 1985 et USEPA, 2001)



A = atome d'halogène (exemple : Cl dans le cas du chloroforme)

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'isoforme CYP2E1 était l'enzyme responsable du métabolisme des THM (Nakajima *et al.*, 1995; Testai *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 1997b; Pankow *et al.*, 1997; Constan *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'isoforme CYP2B1/2 métabolise souvent les mêmes composés que le CYP2E1 mais avec une plus faible affinité (Nakajima *et al.*, 1990). Il a d'ailleurs été démontré que, pour le chloroforme et le BDCM, le CYP2E1 est plus actif à faibles concentrations tandis que le CYP2B1/2 entre en action à des concentrations élevées (Thornton-Manning *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*,

1995). De plus, le CYP1A2 serait également impliqué dans le métabolisme du BDCM (Allis *et al.*, 2001, 2002).

1.2.3.4. Élimination

Les THM sont principalement éliminés sous forme inchangée par l'air exhalé en raison de leur grande volatilité. Une étude a démontré que la souris exhale 40-81% d'une dose orale de THM sous forme inchangée et 5-26% sous forme de CO₂. Pour sa part, le rat exhale 41-67% d'une dose orale de THM toujours sous forme inchangée, et 4-18% sous forme de CO₂. Une faible proportion de la dose est retrouvée dans l'urine (Mink *et al.*, 1986).

1.2.4. Impact sur la santé

1.2.4.1. Les études toxicologiques

Le foie, les reins et les intestins sont les organes où les THM exercent leur plus grande toxicité. Les tableaux 3, 4 et 5 présentent les résultats des principales études chroniques, sub-chroniques, sub-aiguës et aiguës ayant porté sur les THM. Les études chroniques ont montré que le chloroforme entraîne principalement la formation de carcinomes hépatocellulaires chez la souris et de tumeurs au niveau des reins chez le rat. Chez le chien, on a observé des kystes adipeux au foie ainsi qu'une élévation des taux d'enzymes dans le sérum (ALAT) appuyant ainsi le dommage causé au niveau du foie. Cette étude a permis de déterminer un LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level) pour le chloroforme, c'est à dire la plus petite dose pour laquelle on observe l'apparition d'effets néfastes. Le LOAEL pour le chloroforme est de 12,9 mg/kg/j (Heywood *et al.*, 1979). On a également utilisé le poisson dans les études chroniques sur le chloroforme. On a observé des lésions au niveau de la vésicule biliaire (Toussaint *et al.*, 2001). Lorsque le BDCM est administré de façon chronique à des rongeurs, il entraîne la formation de carcinomes hépatocellulaires et rénaux ainsi que des néoplasmes au niveau des intestins. Le LOAEL déterminé chez la souris est de 17,9 mg/kg/j et l'effet néfaste observé à cette dose est une

cytomégalie au niveau des reins (Dunnick *et al.*, 1987). La cytomégalie rénale réfère à l'enflure des cellules rénales. Les études chroniques démontrent que le DBCM entraîne des carcinomes hépatocellulaires chez la souris et de la nécrose rénale chez le rat. On a déterminé, dans une étude orale chez le rat, un NOEL (No Observable Effect Level – la plus grande dose ne démontrant aucun effet) de 21,4 mg/kg/j et un LOAEL de 42,9 mg/kg/j, l'effet critique étant les lésions hépatiques (Dunnick *et al.*, 1985). Enfin, on observe des néoplasmes intestinaux chez le rat exposé au TBM de façon chronique. Les NOEL et LOAEL mesurés pour ce composé sont respectivement de 17,9 mg/kg/j et 35,7 mg/kg/j. Ces doses ont été déterminées grâce à une étude orale chez le rat où l'effet critique était l'apparition de lésions hépatiques (NTP, 1989).

En général, on remarque que le rein est l'organe cible chez le rat comparativement au foie chez la souris. Les intestins semblent toutefois être plus affectés par l'exposition aux THM bromés. La dose administrée, l'organe cible, l'espèce et le sexe sont tous des facteurs qui doivent être considérés lors d'études sur la cancérogénicité des THM. De plus, le véhicule dans lequel on administre les THM semble jouer un rôle important dans la formation de tumeurs. Contrairement à l'huile de maïs, lorsque le chloroforme est administré dans l'eau de boisson, il n'entraîne pas une prolifération cellulaire ou une nécrose au niveau du foie (Larson *et al.*, 1994a). Même observation pour le BDCM, il est plus néphrotoxique lorsqu'il est administré dans l'huile de maïs que dans l'eau de boisson (Lilly *et al.*, 1994). Cependant, une étude récente a démontré que la formation de lésions pré-néoplasiques au niveau du côlon, suite à une exposition au BDCM, est indépendante de la voie d'administration (eau de consommation *versus* gavage dans l'huile de maïs) (Geter *et al.*, 2004).

L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) classe le BDCM et le TBM comme cancérogènes probables chez les humains (USEPA, 2002a, c). On estime que les données sur la cancérogénicité de ces composés sont suffisantes chez les animaux mais encore insuffisantes chez

les humains. Le chloroforme est également classé comme cancérigène probable mais uniquement à fortes doses (USEPA, 2003). Pour sa part, le DBCM est classé comme cancérigène possible, les données sur la cancérigénicité étant limitées chez les animaux et insuffisantes chez les humains (USEPA, 2002b).

Quatre importantes études sub-chroniques (90 jours) ont été réalisées chez des rongeurs (Munson *et al.*, 1982; Chu *et al.*, 1982b; Bull *et al.*, 1986; DeAngelo *et al.*, 2002). Elles ont permis d'observer principalement des lésions au niveau du foie, des lésions pré-néoplasiques au niveau du côlon et une inflammation des cellules rénales. De plus, on a remarqué une modification de certains paramètres biochimiques faisant référence aux dommages hépatiques et rénaux. Dans l'étude de Chu et collaborateurs (1982a), on a remarqué également des lésions au niveau des glandes thyroïdes.

Plusieurs études sub-aiguës et aiguës ont été réalisées sur les trihalométhanes. Suite à une exposition de courte durée, on a observé en général une altération des indicateurs biochimiques associés généralement à des dommages hépatiques et rénaux. On a remarqué également une prolifération cellulaire au niveau du foie et de la nécrose hépatique et rénale. L'éventail des lésions hépatiques et rénales variait en fonction du THM administré, de la dose, de la durée et de l'espèce étudiée. Une seule étude a examiné l'effet des THM sur le cœur. Les résultats ont démontré que le DBCM et le chloroforme entraînent certaines altérations cardio-vasculaires et plus précisément une dépression du myocarde dans le cas du DBCM (Müller *et al.*, 1997). Dans une étude où des rats étaient traités par gavage, Chu et collaborateurs (1980) ont déterminé une LD50 pour chacun des THM. La LD50 réfère à la dose capable d'engendrer la mort de 50% des animaux exposés. La LD50 pour le chloroforme, le BDCM, le DBCM et le TBM était respectivement de 1117, 969, 848 et 1147 mg/kg chez la femelle et de 908, 916, 1186 et 1388 mg/kg chez le mâle. Ces informations révèlent que, chez le rat, le bromoforme est le trihalométhane le moins toxique. Le

BDCM est le plus toxique chez la femelle tandis que le chloroforme est le plus toxique chez le mâle, et ce, sans égard au type de toxicité.

Quelques auteurs ont étudié le pouvoir tératogène des THM. La plupart conclut que l'administration orale de THM n'entraînent pas d'effets tératogènes, que leurs effets néfastes sur la reproduction sont observés uniquement aux doses toxiques chez la mère. Une diminution du poids des foetus a été observé chez des rates exposées, du sixième au quinzième jour de gestation, à une dose orale de 126 mg/kg de chloroforme (Thompson *et al.*, 1974). Aucun effet sur le développement et la reproduction n'a été rapporté chez des lapines exposées, du sixième au dix-huitième jour de gestation, à une dose orale de 50 mg/kg de chloroforme (Thompson *et al.*, 1974). Dans une étude chez des souris, aucun effet sur la reproduction et la fertilité n'a été observé chez la génération F1 exposée au chloroforme à une dose orale de 41 mg/kg/jour. Cette dose a cependant entraîné une dégénération des hépatocytes chez la femelle (Gulati *et al.*, 1988). Ruddick et collaborateurs (1983) ont démontré que les THM ne produisent pas d'effets tératogènes mais que le chloroforme, le BDCM et le DBCM entraînent une diminution du poids corporel chez les mères exposées. Dans le cas du chloroforme, le poids des foetus était également diminué. Narotsky et collaborateurs (1997) ont observé que le BDCM n'entraîne aucun effet sur le poids des foetus. Des études récentes sur le BDCM ont révélé que ce composé entraîne des effets négligeables dans le développement du foetus des rats et des lapins lorsque administré dans l'eau de consommation des mères (Christian *et al.*, 2001a, b, 2002). L'administration des THM par inhalation peut toutefois entrainer certains effets tératogènes. Chez des rates exposées à une dose de 300 ppm de chloroforme du sixième au quinzième jour de gestation, on a remarqué que 61% des implantations étaient résorbées. Le poids et la longueur des foetus étaient également diminués à cette dose (Schwetz *et al.*, 1974). Dans une autre étude, une augmentation de l'incidence de palais fendu et un retard de l'ossification du squelette ont été observés chez des foetus de souris exposées à 100 ppm de chloroforme (Murray *et al.*, 1979).

La génotoxicité des THM a également été étudiée. Un composé est considéré génotoxique lorsqu'il cause du dommage à l'ADN ou encore engendre des mutations. Les essais *in vitro* sur *Salmonella typhimurium* (test de Ames) et *Escherichia coli* ont révélé que, contrairement aux THM bromés, le chloroforme est incapable d'induire des mutations génétiques (Simmon *et al.*, 1977; WHO, 1994; DeMarini *et al.*, 1997). De plus, le chloroforme se lie très faiblement à l'ADN (Pereira *et al.*, 1982). Dans une étude *in vivo*, aucun des quatre THM n'a entraîné des ruptures de brins d'ADN (Potter *et al.*, 1996). Une étude récente a confirmé que les THM n'engendrent pas de ruptures de brins d'ADN dans les cellules épithéliales du foie, des reins et du duodénum chez le rat autant en condition *in vivo* que *in vitro*. Cependant, cette même étude a démontré que les trois THM bromés peuvent entraîner des ruptures de brins d'ADN dans des cellules leucémiques (lymphoblastes) chez l'humain (Geter *et al.*, 2004). En ce qui a trait à l'échange de chromatides sœurs, les quatre THM se sont révélés capables d'induire des échanges autant en condition *in vitro* chez des lymphocytes humains qu'en condition *in vivo* chez des cellules de moelle osseuse de souris. Le bromoforme était le composé le plus actif, suivi du BDCM et du DBCM. Le chloroforme était beaucoup moins actif que les THM bromés (Morimoto *et al.*, 1983). Enfin, une étude a démontré que les quatre THM sont capables d'induire des aberrations sur les chromosomes sous des conditions *in vivo* chez des cellules de moelle osseuse de rat (Fujie *et al.*, 1990). En général, la génotoxicité des THM demeure controversée. La plupart des études tendent à montrer que les THM bromés sont génotoxiques, c'est-à-dire capable d'attaquer directement l'ADN et ainsi initier et promouvoir la formation de tumeurs cancérogènes. Pour ce qui est du chloroforme, la majorité conclue qu'il est un composé non-génotoxique bien que les résultats des études demeurent contradictoires. Il est probable que la génotoxicité associée au chloroforme soit causée par son métabolite principal, le phosgène. On estime que ce dernier réagit fortement avec les protéines tissulaires et les macromolécules cellulaires et entraîne ainsi du dommage dans les tissus et la mort des cellules. Les tumeurs au foie et aux reins induites par le chloroforme sont associées à une cytotoxicité

persistente et une prolifération cellulaire régénératrice. Il est probable que cette prolifération cellulaire soutenue augmente la probabilité d'une mutation spontanée au niveau d'une cellule pouvant ainsi résulter en cancer (USEPA, 2001).

Tableau 3. Les principales études chroniques ayant porté sur les trihalométhanes.

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
Chloroforme	Souris	Orale	138, 277 mg/kg (M) 238, 477 mg/kg (F) (huile de maïs)	Carcinomes hépatocellulaires	NCI, 1976
Chloroforme	Rat	Orale	90, 180 mg/kg (M) 100, 200 mg/kg (F) (huile de maïs)	Tumeurs rénales (M)	NCI, 1976
Chloroforme	Chien	Orale	15, 30 mg/kg (capsules de gélatine)	Kyste adipeux au foie	Heywood et al., 1979
Chloroforme	Souris (F) Rat (M)	Orale	200, 400, 900, 1800 mg/L (eau de boisson)	Tumeurs rénales (rat)	Jorgenson et al., 1985
BDCM	Souris Rat	Orale	50, 100 mg/kg (souris) 40, 80 mg/kg (rat) (huile de maïs)	Carcinomes hépatocellulaires (souris) Nécrose rénale (rat F)	Dunnick et al., 1985 (NTP)
BDCM	Souris Rat	Orale	25, 50 mg/kg (souris M) 75, 150 mg/kg (souris F) 50, 100 mg/kg (rat) (huile de maïs)	Carcinomes hépatocellulaires (souris F) Néoplasmes rénaux (rat et souris M) Néoplasmes intestinaux (rat)	Dunnick et al., 1987 (NTP)
Chloroforme, BDCM	Rat	Orale	2 ml (2,9 g)/L (CHCl ₃) 1,2 ml (2,4 g)/L (BDCM) (eau de boisson)	Carcinomes hépatocellulaires (CHCl ₃) Néoplasmes hépatiques (BDCM)	Tumasonis et al., 1987
TBM	Souris Rat	Orale	50, 100 mg/kg (souris M) 100, 200 mg/kg (rat, souris F) (huile de maïs)	Néoplasmes intestinaux (rat)	NTP, 1989
BDCM	Rat	Orale	6, 26, 138 mg/kg (M) 8, 32, 168 mg/kg (F) (capsules de gélatine)	Dégénérescence adipeuse hépatique Prolifération au niveau de la voie biliaire principale	Aida et al., 1992a

Tableau 3. (suite)

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
Chloroforme	Poisson	Orale, branchiale, dermique	0,017, 0,151, 1,463 mg/L	Lésions à la vésicule biliaire (1,463 mg/L)	Toussaint <i>et al.</i> , 2001
BDCM	Souris (M) Rat (M)	Orale	0,06, 0,28, 0,49 g/L (souris) 0,06, 0,33, 0,62 g/L (rat) (eau de boisson)	Diminution du poids des reins (souris) Carcinomes hépatocellulaires (rat) Hyperplasie des tubules rénaux (rat)	George <i>et al.</i> , 2002

Tableau 4. Les principales études subchroniques ayant porté sur les trihalométhanes.

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
Chloroforme	Souris	Orale	50, 125, 250 mg/kg/j (Alkamuls)	Dégénérescence des hépatocytes Inflammation des cellules rénales	Munson <i>et al.</i> , 1982
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Rat	Orale	5, 50, 500, 2500 ppm (eau de boisson)	Diminution de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) (TBM) Réduction des lymphocytes Lésions hépatiques Lésions au niveau des glandes thyroïdes	Chu <i>et al.</i> , 1982b
Chloroforme	Souris	Orale	60, 130, 270 mg/kg (huile de maïs, émulsion)	↑ SGOT, ↑ BUN, ↓ triglycérides (huile) Cirrhose, dégénérescence des cellules hépatiques (huile) ↓ poids corporel, ↑ poids du foie	Bull <i>et al.</i> , 1986
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Souris Rat	Orale	0,5 g/L (CHCl ₃), 0,7 g/L (BDCM), 0,9 g/L (DBCM), 1,1 g/L (TBM) (eau de boisson)	Lésions pré-néoplasiques au niveau du côlon	DeAngelo <i>et al.</i> , 2002

Tableau 5. Les principales études aiguës et subaiguës ayant porté sur les trihalométhanes.

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Souris	Orale	50, 125, 250 mg/kg/j (Alkamuls)	↑ poids du foie, ↓ poids de la rate Dégénérescence du système immunitaire humoral	Munson <i>et al.</i> , 1982
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Rat	Orale	546, 765, 1071, 1500, 2100 mg/kg TBM : 2100 remplacé par 390 mg/kg (huile de maïs)	↑ poids du foie et reins (sauf TBM) Lésions au niveau du foie et reins Inhibition de LDH Diminution des lymphocytes	Chu <i>et al.</i> , 1982a
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Souris	Orale	37, 74, 148 mg/kg 72, 145, 289 mg/kg (TBM) (huile de maïs)	Hyperplasie rénale Cytomégalie et minéralisation intratubulaire (reins) (CHCl ₃ , BDCM) Inflammation focale au niveau du foie	Condie <i>et al.</i> , 1983
BDCM, DBCM, TBM	Rat	Orale	BDCM : 0,024, 0,072, 0,215% (M), 0,024, 0,076, 0,227% (F) DBCM : 0,02, 0,062, 0,185% (M), 0,038, 0,113, 0,338% (F) TBM : 0,068, 0,204, 0,612% (M), 0,072, 0,217, 0,651% (F) (capsules de gélatine)	↓ poids corporel Vacuolisation et enflure des hépatocytes Nécrose hépatique (BDCM, DBCM)	Aida <i>et al.</i> , 1992b
Chloroforme	Souris (F) Rat (M)	Orale	34, 238, 350, 477 mg/kg (souris) 34, 180, 477 mg/kg (rat) (huile de maïs)	Nécrose du tubule rénal (rat) Nécrose hépatique	Larson <i>et al.</i> , 1993

Tableau 5. (suite)

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
BDCM	Souris (F) Rat (F)	Orale	75, 150 mg/kg 300 mg/kg (rat) (Alkamuls)	↑ ALAT, SDH (souris) ↑ LDH, ASAT, BUN, SDH et créatinine (rat) Lésions hépatiques (dégénération des vacuoles) et rénales (rat)	Thornton-Manning <i>et al.</i> , 1994
Chloroforme	Souris (M)	Orale	34, 90, 138, 277 mg/kg/j (huile de maïs)	Dégénération et nécrose du tubule rénal Prolifération cellulaire au niveau du foie	Larson <i>et al.</i> , 1994b
Chloroforme	Souris (F)	Orale	3, 10, 34, 90, 238, 477 mg/kg (huile de maïs) 60, 200, 400, 900, 1800 ppm (eau de boisson)	Prolifération cellulaire et nécrose au niveau du foie (huile de maïs)	Larson <i>et al.</i> , 1994a
BDCM	Rat (M)	Orale	200, 400 mg/kg (huile de maïs et Alkamuls)	Dégénérescence et nécrose au niveau du foie et du tubule rénal (plus toxique dans huile)	Lilly <i>et al.</i> , 1994
Chloroforme	Rat (M)	Orale	10, 34, 90, 180 mg/kg (huile de maïs) 60, 200, 400, 900, 1800 ppm (eau de boisson)	Dégénération du tubule rénal (huile) Prolifération cellulaire au niveau du foie (huile de maïs)	Larson <i>et al.</i> , 1995
Chloroforme, BDCM	Rat (M)	Orale	0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 mmol/kg (Alkamuls)	↑ indicateurs biochimiques d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité	Lilly <i>et al.</i> , 1997a
Chloroforme, BDCM	Rat (M)	Orale	0,4, 0,8, 1,2, 3,0 mmol/kg (BDCM) 0,31, 1,25 mmol/kg (CHCl ₃) (huile d'olive)	Dépression du myocarde (BDCM) Altérations cardio-vasculaires	Müller <i>et al.</i> , 1997

Tableau 5. (suite)

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
Chloroforme, BDCM	Rat (M)	Orale	0,125, 0,1875, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 mmol/kg (Alkamuls)	↑ indicateurs biochimiques d'hépatotoxicité	Keegan <i>et al.</i> , 1998
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Souris (F)	Orale	0,46, 0,92, 2,0 mmol/kg (huile de maïs) 4,0 mmol/kg (CHCl ₃) 0,24 mmol/kg (DBCM) 0,8, 2,0 mmol/kg (TBM)	↑ poids du foie ↑ indicateurs biochimiques d'hépatotoxicité Prolifération cellulaire au niveau du foie	Melnick <i>et al.</i> , 1998

1.2.4.2. Les études épidémiologiques

1.2.4.2.1. Le cancer

C'est au cours des années 70 que les effets des trihalométhanes sur la santé humaine ont commencé à préoccuper les intervenants en santé publique. Pendant cette période, une vingtaine d'études épidémiologiques ont été conduites sur la relation possible entre le cancer et les contaminants retrouvés dans l'eau. La plupart de ces études étaient de type écologique c'est-à-dire, des études où l'évaluation d'un patron de mortalité temporel ou spatial dans la population est établie et où la classification est basée sur des groupes de personnes et non sur des individus. Ce type d'étude ne permet pas de mesurer directement l'association puisque les individus ne sont pas classifiés selon l'exposition. Quelques études cas-témoins ont également été réalisées dans les années 70. Durant ces années, on mesurait rarement les concentrations des trihalométhanes dans les systèmes de traitement d'eau. Les études portaient généralement sur la comparaison entre une eau chlorée et une eau non chlorée ou entre une eau de surface et une eau profonde. De plus, étant donné que le cancer a généralement une période de latence de 20 à 30 ans et que les données sur la qualité de l'eau sont récentes, il s'avère très difficile d'estimer, de façon rétrospective, l'exposition aux THM.

Certaines études ont évalué différents sites de cancer afin de caractériser la spécificité de l'exposition aux trihalométhanes. En 1978, Cantor et collaborateurs ont mesuré l'association entre la mortalité due au cancer et les concentrations de trihalométhanes totaux, de trihalométhanes bromés et de chloroforme. Après ajustement des facteurs démographiques, socio-économiques et industriels, ils ont remarqué une corrélation positive entre les concentrations de trihalométhanes totaux et bromés et les cancers de la vessie et du cerveau. Une étude similaire réalisée par Carlo et collaborateurs (1980) a démontré une corrélation positive entre le cancer du pancréas et l'exposition aux trihalométhanes. De leur côté, Wilkins et Comstock (1981) ont réalisé une étude prospective de cohorte afin d'estimer le risque de cancer dû à l'eau potable. Ils ont identifié la source d'eau pour

trois cohortes, soit une eau de surface, une eau profonde (provenant de puits) et une eau intermédiaire. L'incidence du taux de cancers de la vessie chez les hommes et de cancers du foie chez les femmes était deux fois plus élevée chez les gens exposés à une eau de surface. Une étude cas-témoin sur les différents sites de cancer a été réalisée au début des années 80 au Wisconsin (Young *et al.*, 1981; Kanarek et Young, 1982). Elle a démontré une association entre le cancer du côlon chez les femmes et l'exposition aux trihalométhanes pour une période de plus de 20 ans. L'association était d'autant plus évidente lorsque cette période d'exposition était reliée à une présence élevée de matière organique dans l'eau comme il est généralement le cas pour les eaux de surface. Toutefois, vers la fin des années 80, une seconde étude réalisée au Wisconsin n'a pas été en mesure d'établir une association entre le cancer du côlon et l'exposition aux trihalométhanes (Young *et al.*, 1987).

D'autres études se sont plutôt concentrées sur un type de cancer en particulier. Plusieurs études cas-témoins portant sur le cancer de la vessie ont démontré que l'exposition à une eau de surface entraîne une hausse de l'incidence du taux de cancer à ce site. Dans ce type d'étude, il est difficile de baser l'exposition sur les concentrations exactes de THM étant donné la longue période de latence du cancer. La plupart des études ont procédé par questionnaires afin de connaître les données socio-démographiques des sujets, la période d'exposition, la consommation de tabac, la source d'eau à la résidence et la consommation de boissons, particulièrement le café. Certaines ont questionné l'historique médical et les habitudes de vie. Le tableau 6 présente les principales études ayant observé une augmentation du risque de cancer de la vessie suite à une exposition aux THM. Les résultats présentés sont ceux dont le risque était le plus élevé. Cantor et collaborateurs (1987) ont remarqué une augmentation du risque du cancer de la vessie lorsque les individus étaient exposés à de l'eau de surface pour une période de plus de 40 ans. Dans une seconde étude, ils ont observé que le risque de cancer de la vessie était également élevé lorsque les personnes étaient exposées à de l'eau profonde pendant plusieurs années (Cantor *et*

al., 1998). Cette information laisse supposer que la période d'exposition est probablement plus importante que le taux de THM dans l'eau. Une étude récente a évalué la relation entre l'exposition aux trihalométhanes et la fréquence de micronuclei dans les cellules épithéliales de la vessie. Les micronuclei sont des indicateurs de génotoxicité permettant d'évaluer le potentiel cancérigène des substances. Les résultats ont démontré qu'une exposition variant de 38 à 157 µg/L de trihalométhanes totaux n'endommageait pas l'ADN dans les cellules épithéliales de la vessie. Le risque relatif, par tranche de 10 µg/L de THM totaux, était de 1,01 (IC : 0,97-1,06) chez les fumeurs et 0,996 (IC : 0,961-1,032) chez les non-fumeurs (Ranmuthugala *et al.*, 2003).

Le côlon et le rectum sont également des sites de cancer qui semblent être favorisés par les THM. Le tableau 7 présente les études qui ont démontré une association entre les trihalométhanes et les cancers du rectum et/ou du côlon. On remarque que Hildesheim et collaborateurs (1998) n'ont observé aucune association entre une exposition aux THM et le cancer du côlon. Le tableau 8 présente les études qui ont démontré une association entre les trihalométhanes et les autres types de cancer.

Les études portant sur l'association entre les trihalométhanes retrouvés dans l'eau potable et le cancer soulignent la nécessité d'approfondir les connaissances sur le sujet puisque certaines données pourraient être inquiétantes pour la santé des individus. Les THM semblent avoir un effet principalement au niveau de la vessie. La plupart des études sont cohérentes entre elles et ont un pouvoir de détection et une force d'association assez élevée. On remarque que plus la concentration de THM est élevée, plus il y a présence d'effets néfastes. On remarque également que plus la période d'exposition est longue, plus l'apparition de cancers est évidente.

On retrouve cependant plusieurs limites dans les études sur le cancer lors d'une exposition à une eau chlorée. Premièrement, le lieu de travail est

rarement pris en considération. Ce facteur pourrait grandement influencer les résultats puisque le travailleur moyen alloue presque la moitié de son temps au travail (l'exposition pendant la nuit étant négligeable). De plus, supposant une association positive entre le cancer et l'exposition à l'eau chlorée, il se peut que ce soit la présence d'autres contaminants dans l'eau qui soit responsable des effets néfastes. Une étude sur les sous-produits de désinfection chlorés dans l'eau potable au Canada a révélé que les niveaux d'acides haloacétiques totaux équivalaient ou excédaient les niveaux de trihalométhanes totaux (Williams *et al.*, 1997). La période d'exposition et la mesure des concentrations de THM limitent également les études puisqu'elles sont difficiles à déterminer de façon spécifique. Finalement, même si certains auteurs ont pris en compte les habitudes de vie, aucun d'entre eux n'a mesuré l'exposition par les autres voies.

Tableau 6. Les principales études sur le cancer de la vessie et l'exposition aux trihalométhanes.

Type d'étude	Lieu	Nombre de sujets	Résultats	Source
Étude écologique	États-Unis (1968-71)	923 comtés en 1970 comparés à population en 1960	[BTHM] : chez hommes (r = 0,38) chez femmes (r = 0,45) (similaires pour [TTHM])	Cantor <i>et al.</i> , 1978
Étude de cohorte	Washington County, Maryland (1963-75)	31 000 sujets	Eau de surface : hommes RR : 1,8 (0,8-4,75) femmes RR : 1,6 (0,54-6,32)	Wilkins et Comstock, 1981
Cas-Témoins	10 endroits au États-Unis (1977-78)	Hommes: 2116 cas, 3892 témoins Femmes: 689 cas, 1366 témoins	Exposition ≥ 60 années : tous - non-fumeurs OR : 3,1 (1,3-7,3) femmes OR : 3,2 (1,2-8,7)	Cantor <i>et al.</i> , 1987
Cas-Témoins	Colorado (1990-91)	327 cas 261 témoins	Exposition ≥ 30 années OR : 1,8 (1,1-2,9)	McGeehin <i>et al.</i> , 1993
Cas-Témoins	Ontario (1992-94)	696 cas 1545 témoins	Exposition ≥ 35 années OR : 1,41 (1,1-1,81) THM ≥ 50 µg/L OR : 1,63 (1,08-2,46)	King <i>et al.</i> , 1996
Cas-Témoins	Washington County, Maryland (1975-92)	294 cas 2326 témoins	Exposition ≥ 40 années : fumeurs ou ex OR : 2,8 (1,0-6,9)	Freedman <i>et al.</i> , 1997
Cas-Témoins	Iowa (1986-89)	1123 cas 1983 témoins	Exposition ≥ 60 années : hommes OR : 1,9 (1,1-3,6)	Cantor <i>et al.</i> , 1998

OR = odds ratio = rapport des cotes

RR = risque relatif

BTHM = trihalométhanes bromés

TTHM = trihalométhanes totaux

Tableau 7. Les principales études sur le cancer du côlon et/ou du rectum et l'exposition aux trihalométhanes.

Type d'étude	Lieu	Nombre de sujets	Résultats	Source
Cas-Témoins	Louisiane (1969-78)	286 cas 219 témoins	Eau de surface : rectum OR : 2,07 (1,49-2,88)	Gottlieb <i>et al.</i> , 1981
Cas-Témoins	Wisconsin (1972-77)	8029 cas 8029 témoins	Eau de surface : côlon chez femmes OR : 2,81	Young <i>et al.</i> , 1981
Cas-Témoins	Wisconsin (1972-77)	8029 cas 8029 témoins	Exposition > 20 années : côlon chez femmes OR : 1,5 (1,06-2,14) Matière organique ↑ + 20 ans d'exposition : OR : 3,3 (1,45-7,48)	Kanarek et Young, 1982
Étude de cohorte	Iowa (1985-92)	28 237 femmes en post-ménopause	Exposition à 14-287 µg/L chloroforme : RR : 1,68 (1,11-2,53)	Doyle <i>et al.</i> , 1997
Cas-Témoins	Iowa (1986-89)	560 cas (côlon) 537 cas (rectum) 1983 témoins	Aucune association entre une exposition de longue durée et cancer du côlon Exposition ≥ 60 années : rectum OR : 2,61 (1,5-5,0) Exposition ≥ 40 années et consommation de fibre ↓ : rectum OR : 2,43 (1,5-4,0)	Hildesheim <i>et al.</i> , 1998
Cas-Témoins	Ontario (1992-94)	767 cas (côlon) 661 cas (rectum) 1545 témoins	Exposition > 35 années et THM > 50 µg/L : côlon chez hommes OR : 2,10 (1,21-3,66)	King <i>et al.</i> , 2000

OR = odds ratio = rapport des cotes

Tableau 8. Les principales études sur le cancer (autre que le cancer colorectal) et l'exposition aux trihalométhanes.

Type d'étude	Lieu	Nombre de sujets	Résultats	Source
Étude écologique	États-Unis (1968-71)	923 comtés aux États-Unis en 1970 comparés à la pop. en 1960	[BTHM] : cerveau chez hommes et femmes ($r = 0,24$ et $0,19$)	Cantor <i>et al.</i> , 1978
Étude écologique	Erie County, NY (1973-76)	4255 cas de cancer	[THM] : pancréas chez hommes ($r = 0,16$)	Carlo et Mettlin, 1980
Étude de cohorte	Washington County, Maryland (1963-75)	31 000 sujets	Eau de surface : foie chez femmes RR : 1,81 (0,64-6,79)	Wilkins et Comstock, 1981
Cas-Témoins	Washington County, Maryland (1975-89)	101 cas 206 témoins	Eau chlorée : pancréas OR : 2,2 (1,2-3,95)	IJsselmuiden <i>et al.</i> , 1992
Cas-Témoins	Iowa (1984-1987)	375 cas 2434 témoins	Exposition ≥ 40 années : cerveau chez hommes OR : 2,5 (1,2-5,0)	Cantor <i>et al.</i> , 1999

OR = odds ratio = rapport des cotes

RR = risque relatif

BTHM = trihalométhanes bromés

1.2.4.2.2. La reproduction

Au début des années 80, certains chercheurs se mirent à questionner les effets néfastes potentiels de l'exposition aux THM chez les femmes enceintes. Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées chez des femmes enceintes exposées aux trihalométhanes dans l'eau de consommation. Certaines études ont simplement comparé l'exposition à une eau chlorée *versus* un eau non-chlorée tandis que d'autres ont estimé l'exposition à partir de mesures de THM totaux dans les systèmes de traitement d'eau. Pour ce faire, on a divisé les concentrations retrouvées en différentes classes. On retrouve généralement peu de gens dans la classe d'exposition la plus élevée (généralement > 100 µg/L). Ceci représente une limite importante dans ce type d'étude. Certains auteurs ont mesuré l'exposition à chacun des THM tandis que d'autres se sont basés sur la consommation individuelle d'eau en plus des mesures de trihalométhanes dans les systèmes de traitement. Ces études ont eu recours à des questionnaires afin de déterminer la consommation individuelle et contrôler les facteurs confondants potentiels. Dans la plupart des cas, les facteurs pris en compte étaient l'âge de la mère, les grossesses antécédentes, les soins parentaux, la race et l'éducation de la mère. Le tableau 9 résume les principales études épidémiologiques concernant l'exposition aux THM et les effets néfastes sur la reproduction. Les données ne prennent pas en compte les études portant sur la comparaison entre diverses méthodes de désinfection de l'eau. Il est important de mentionner que ce ne sont pas toutes les études réalisées qui ont démontrées des effets néfastes. Par exemple, Yang et collaborateurs (2000) ont déterminé qu'il n'y avait aucune association entre l'exposition à une eau chlorée et un bébé de petit poids à la naissance.

Tableau 9. Les principales études épidémiologiques concernant l'exposition aux trihalométhanes et les effets néfastes sur la reproduction.

Type d'étude	Lieu	Nombre de sujets	Résultat	OR ou RR	Source
Cas-Témoins	Iowa (1989-90)	159 cas 795 témoins	CHCl ₃ > 10µg/L : ↑ retard croissance intra-utérine	1,8 (1,1-2,9)	Kramer <i>et al.</i> , 1992
Transversale	New Jersey (1985-88)	80 938 naissances 594 morts fœtales	TTHM > 100µg/L : ↑ petits poids ↑ malformations fente palatine TTHM > 80µg/L : ↑ malformations à la naissance ↑ malformations SNC ↑ malformations tube neural ↑ malformations cœur	1,5 (1,04-2,09) 3,17 (0,64-10,34) 1,57 (1,7-2,26) 2,59 (1,14-5,55) 2,96 (0,78-9,84) 1,83 (0,68-4,37)	Bove <i>et al.</i> , 1995
Cas-Témoins	Caroline du Nord (1988-91)	418 cas 341 témoins	Chaque ↑ de 50µg/L TTHM : ↑ avortements spontanés	1,7 (1,1-2,7)	Savitz <i>et al.</i> , 1995
Cohorte prospective	Californie (1988-91)	5144 femmes enceintes	BDCM, ≥ 5 verres d'eau/jour : ↑ avortements spontanés TTHM, ≥ 5 verres d'eau/jour, ↑ avortements spontanés	2,0 (1,3-3,5) 3,0 (1,4-6,6)	Waller <i>et al.</i> , 1998
Cohorte rétrospective	Colorado (1990-93)	2045 naissances	TTHM > 61µg/L : ↑ petits poids (3 ^e trimestre) ↑ petits poids (à terme)	2,1 (1,0-4,8) 5,9 (2,0-17,0)	Gallagher <i>et al.</i> , 1998
Cohorte rétrospective	Nouvelle-Écosse (1988-95)	49 842 naissances	TTHM > 100µg/L : ↑ mort-nés ↑ anomalies chromosomales	1,66 (1,09-2,52) 1,38 (0,73-2,59)	Dodds <i>et al.</i> , 1999

OR = odds ratio = rapport des cotes

RR = risque relatif

TTHM = trihalométhanes totaux

Tableau 9. (suite)

Type d'étude	Lieu	Nombre de sujets	Résultat	OR ou RR	Source
Cas-Témoins	New Jersey (1993-94)	112 cas 248 témoins	Eau de surface : ↑ malformations tube neural TTHM > 80µg/L : ↑ malformations tube neural	1,5 (0,9-2,5) 1,6 (0,7-3,6)	Klotz <i>et al.</i> , 1999
Cohorte rétrospective	Norvège (1993-1995)	141 077 naissances	Eau chlorée : ↑ malformations générales ↑ malformations tube neural ↑ malformations syst. urinaire	1,14 (0,99-1,31) 1,26 (0,61-2,62) 1,99 (1,10-3,57)	Magnus <i>et al.</i> , 1999
Cohorte rétrospective	Nouvelle-Écosse (1988-95)	49 842 naissances	CHCl ₃ > 100µg/L : ↑ mort-nés BDCM > 20µg/L : ↑ mort-nés	1,56 (1,04-2,34) 1,98 (1,10-1,53)	King <i>et al.</i> , 2000
Cohorte rétrospective	Taiwan (1994-1996)	18 025 femmes enceintes	Eau chlorée : accouchements avant terme	1,34 (1,15-1,56)	Yang <i>et al.</i> , 2000

OR = odds ratio = rapport des cotes

RR = risque relatif

TTHM = trihalométhanes totaux

Les effets néfastes sur la reproduction associés à une exposition aux trihalométhanes semblent varier d'une étude à l'autre. L'estimation de l'exposition est la grande limite de toutes ces études. Seulement une étude a considéré le lieu de résidence. Cependant, on estime que plus de 20% des femmes enceintes déménagent durant leur grossesse (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). Aucun auteur n'a pris en compte l'exposition en dehors de la résidence comme par exemple, l'exposition au travail. On ne sait pas non plus quelle est la période d'exposition la plus critique lors du développement fœtal. La plupart des études supposent que le premier trimestre est critique en ce qui a trait aux avortements spontanés et aux anomalies structurales et que le troisième trimestre est critique aux retards de croissance intra-utérine. De plus, aucune information quant à l'exposition paternelle n'est disponible.

1.2.5. Les recommandations des niveaux d'exposition admissibles

Depuis 1993, la recommandation pour la qualité de l'eau potable au Canada est de 100 µg/L pour les trihalométhanes (Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable, 2002). Cette recommandation est fondée sur le risque de cancer rapporté dans les études animales sur le chloroforme, le THM retrouvé le plus souvent et en plus grande concentration dans l'eau potable. Elle repose également sur une concentration moyenne annuelle puisque la concentration de THM est généralement plus grande en été qu'en hiver. Cette recommandation a été adoptée à titre provisoire en attendant l'établissement du risque associé aux autres SPD. L'Agence de Protection Environnementale des États-Unis (Environmental Protection Agency, 1998) est plus sévère en ce qui concerne les trihalométhanes totaux, sa norme est de 80 µg/L. Cette concentration réfère au niveau maximal permis dans l'eau.

Le Règlement québécois sur la qualité de l'eau potable en vertu de la Loi sur la qualité de l'environnement permet également une concentration moyenne annuelle maximale de 80 µg/L pour les trihalométhanes totaux. Ce

Règlement est en vigueur depuis le 28 juin 2001 seulement (Ministère de l'Environnement du Québec, 2001). L'ancien Règlement sur l'eau potable avait été adopté en 1984 et permettait une concentration maximale de 350 µg/L. Pour sa part, l'Organisation mondiale de la santé (WHO, 1996) n'a pas de norme relative aux THM totaux mais plutôt des valeurs guides pour chacun des THM. Pour le TBM et le DBCM, la valeur guide est de 100 µg/L. Elle est de 60 µg/L pour le BDCM et 200 µg/L pour le chloroforme.

1.3. Les acides chloroacétiques

1.3.1. Propriétés physico-chimiques

Les acides chloroacétiques font partie de la famille des acides haloacétiques. Ils sont des composés non volatils ayant une grande solubilité dans l'eau. A température ambiante, le MCA et le TCA se retrouvent sous forme solide tandis que le DCA se retrouve sous forme liquide. Le tableau 10 présente les propriétés physico-chimiques des acides chloroacétiques.

Tableau 10. Propriétés physico-chimiques des acides chloroacétiques.

Propriétés physico-chimiques	MCA	DCA	TCA
Formule moléculaire	ClCH ₂ COOH	CHCl ₂ COOH	CCl ₃ COOH
Poids moléculaire (g/mole)	94,5	128,95	163,4
Densité (mg/L)	1,58	1,563	1,629
Point d'ébullition (°C)	189	193-194	197-197
Point de fusion (°C)	63, 55-56 et 50	9,7 et -4	57-58

Adapté de Merck, 1989.

1.3.2. Sources d'exposition

Puisque les acides chloroacétiques ne sont pas volatils et sont peu absorbés par la peau (sauf en ce qui concerne le MCA), la principale voie d'exposition est la voie orale. Une étude canadienne a mesuré des concentrations moyennes de TCA de 27,8 à 56,7 µg/L en hiver et de 34,0 à 48,9 µg/L en été, avec une concentration maximale de 473,1 µg/L mesurée à un site en particulier durant l'hiver (Williams *et al.*, 1997). Ces concentrations ont été

mesurées dans 35 usines de traitement d'eau par le chlore ainsi que dans leur système de distribution (généralement situé à 5-10 km de l'usine). Les concentrations moyennes de DCA mesurées étaient de 13,2 à 15,6 µg/L en hiver et de 19,0 à 21,1 µg/L en été. Le MCA était retrouvé dans l'eau en faibles concentrations variant de 0,3 à 9,7 µg/L. Une étude effectuée au Massachusetts a mesuré, dans l'eau de robinet, des concentrations entre 34 et 161 µg/L pour le TCA et entre 63 et 133 µg/L pour le DCA (Uden *et al.*, 1983).

Deux études ont démontré que seul le TCA pourrait jouer un rôle de biomarqueur d'exposition aux SPD dans l'eau potable et ce, principalement en raison de sa grande persistance dans le corps humain (Kim *et al.*, 1999; Froese *et al.*, 2002).

1.3.3. Toxicocinétique

1.3.3.1. Absorption

Une fois ingérés, les acides chloroacétiques sont rapidement absorbés par le tractus gastro-intestinal (Larson *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993). La constante d'absorption (K_a) pour le TCA a été évaluée à 2,81 h⁻¹ (Schultz *et al.*, 1999). L'absorption pulmonaire des acides chloroacétiques est considérée négligeable étant donné la non-volatilité de ces composés.

Xu et collaborateurs (2002) ont déterminé que, contrairement aux THM, l'absorption par la peau est négligeable pour le TCA et le DCA, les valeurs de K_p se situant autour de 0,0015 cm/h. D'autres ont estimé que le coefficient de perméabilité pour le DCA pouvait être aussi faible que 9×10^{-5} cm/h (Kim *et al.*, 1998). On estime cependant que le MCA est rapidement et efficacement absorbé par la peau. Une exposition à une surface aussi faible que 1% de la peau requiert une hospitalisation (Kulling *et al.*, 1992).

1.3.3.2. Distribution

Les acides chloroacétiques se distribuent rapidement et principalement au niveau du foie et du sang. Certaines études, dans lesquelles on a administré des doses de MCA marqué (^{14}C), ont révélé que le MCA peut également se distribuer dans les reins, l'estomac, les poumons, le cœur et le gras (Bhat *et al.*, 1990; Saghir *et al.*, 2001). Des études similaires ont démontré que le DCA et le TCA se distribuent dans les reins, les muscles, la peau, le gras et les intestins (Lin *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2000). L'accumulation de MCA dans les tissus se fait d'abord dans les tissus hydrophiliques et ensuite dans les tissus lipophiliques (Bhat *et al.*, 1990). On peut supposer que ce comportement est également similaire en ce qui concerne les deux autres acides.

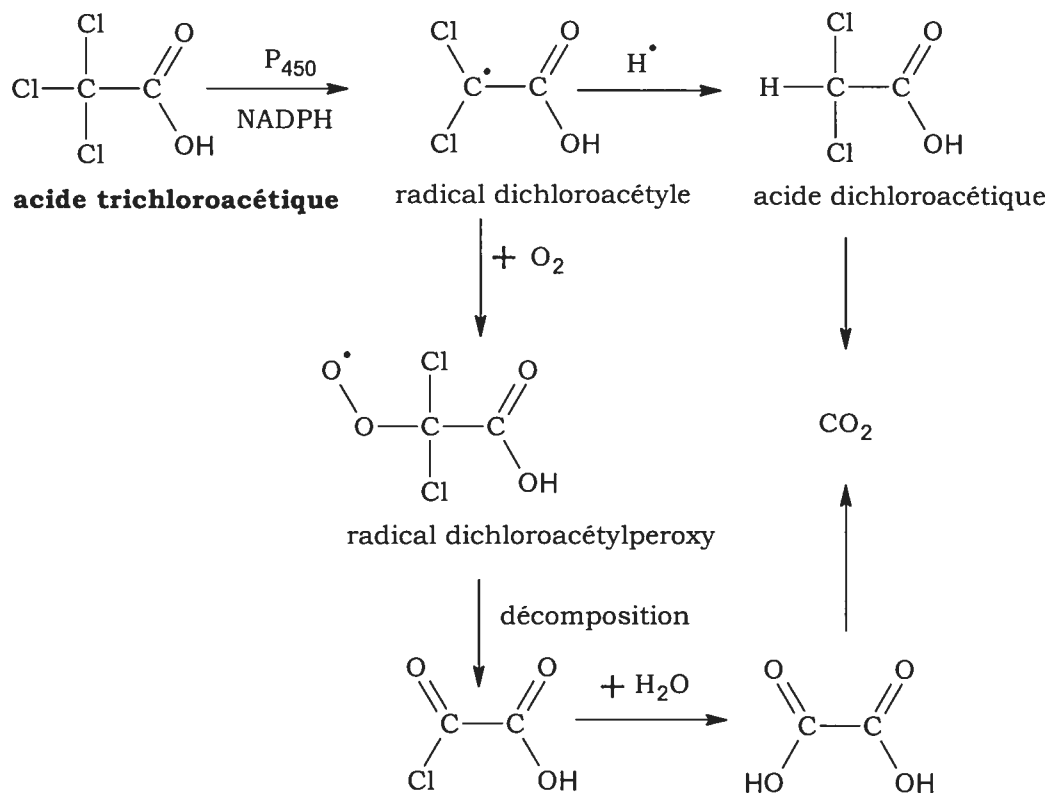
Le volume apparent de distribution est le volume dans lequel la substance se distribue et qui détermine une concentration plasmatique. Pour des rats exposés à une dose de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de TCA ou de DCA, on a calculé un volume apparent de distribution respectivement de 782 et 618 ml/kg pour le TCA et le DCA. Cette information suggère que les deux composés se distribuent de façon similaire dans le plasma. Cependant, le TCA se lie beaucoup plus facilement aux protéines plasmatiques que le DCA. On estime que 50 à 90% d'une dose de TCA se lie aux protéines plasmatiques comparativement à moins de 10% pour le DCA (Müller *et al.*, 1972; Schultz *et al.*, 1999). Le MCA est également reconnu pour sa grande affinité pour les protéines plasmatiques; on estime cette capacité autour de 50%. La liaison des acides chloroacétiques se fait principalement à l'albumine et en plus faible proportion, à l'hémoglobine (Kaphalia *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1992; Toxopeus *et al.*, 1998).

1.3.3.3. Métabolisme

Les acides chloroacétiques sont métabolisés principalement au niveau du foie. Le TCA est très peu métabolisé comparativement au DCA et au MCA. On estime que plus de 50% d'une dose administrée de TCA se retrouve sous

forme inchangée dans l'urine (Green *et al.*, 1985; Larson et Bull, 1992). La déchloration réductrice est considéré l'événement principal dans le métabolisme du TCA qui se transforme alors en DCA. On suppose que lors de la réduction qui produit un atome de chlore, il y a un clivage homolytique qui est catalysé par un enzyme du cytochrome P450 et formation d'un radical dichloroacétyle libre. Ce radical pourrait ensuite soit extraire un atome d'hydrogène aux lipides afin de se transformer en DCA ou encore réagir avec l'oxygène et se transformer en radical dichloroacétylperoxy (Larson et Bull, 1992). La décomposition et ensuite l'hydrolyse de ce radical produit du CO₂ qui est, de toute évidence, exhalé (Figure 2). Le métabolisme du TCA se fait principalement au niveau des microsomes et on considère que le CYP2E1 est le principal enzyme impliqué (Ni *et al.*, 1996).

Figure 2. Étapes dans le métabolisme de l'acide trichloroacétique (Adaptée de Larson et Bull, 1992)



Le DCA est un composé métabolisé très rapidement, moins de 2% d'une dose administrée se retrouve sous forme inchangée dans l'urine (Larson et Bull, 1992). Le DCA subit une déchloration et se transforme en MCA et, après conjugaison avec le glutathion (James *et al.*, 1997), en glyoxylate. Ce dernier est ensuite biotransformé en glycolate, glycine, oxalate et CO₂ (Stacpoole *et al.*, 1998). Des études ont démontré que le métabolisme du DCA se fait principalement dans le cytosol, mais que la biotransformation du glyoxylate en glycine et CO₂ se fait dans les mitochondries (Figure 3) (Lipscomb *et al.*, 1995; James *et al.*, 1998). Certains auteurs suggèrent que le DCA est également métabolisé dans les microsomes par le cytochrome P450 et, conjointement avec le TCA, joue un rôle important dans la peroxydation des lipides (Larson et Bull, 1992; Ni *et al.*, 1996).

Pour ce qui est du métabolisme du MCA, Yllner (1971) a rapporté que 66-85% d'une dose était métabolisée en S-carboxyméthyl-L-cystéine et en acide thiodiacétique et en plus faible proportion en acide glycolique. Ce dernier est oxydé en CO₂. Le MCA se conjugue avec le glutathion. La figure 4 présente les différentes étapes dans le métabolisme du MCA tel que proposé par Yllner. L'âge, le poids corporel et l'alimentation sont des facteurs pouvant influencer le métabolisme des acides chloroacétiques (James *et al.*, 1998).

Figure 3. Étapes dans le métabolisme de l'acide dichloroacétique (Adaptée de James *et al.*, 1998)

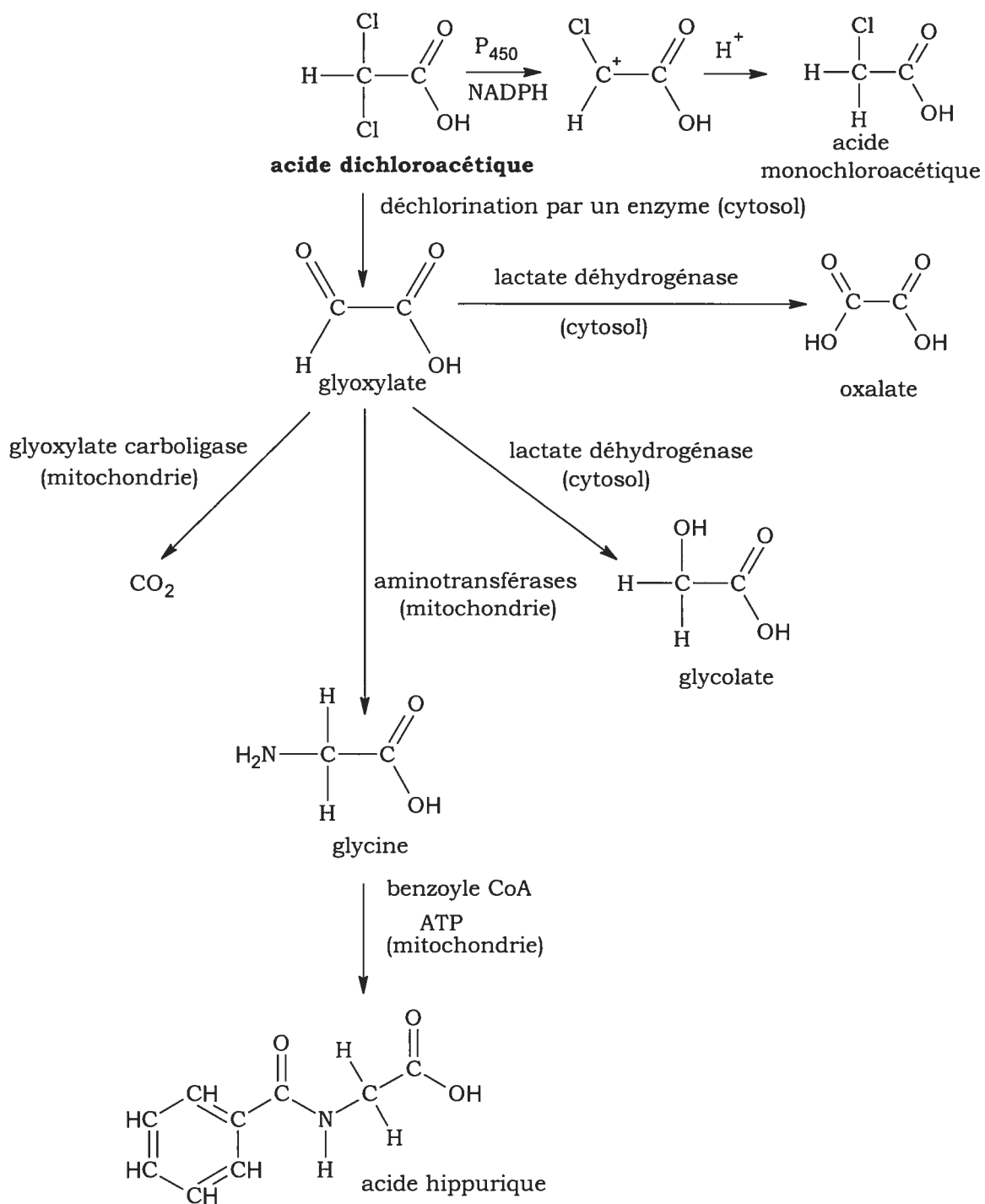
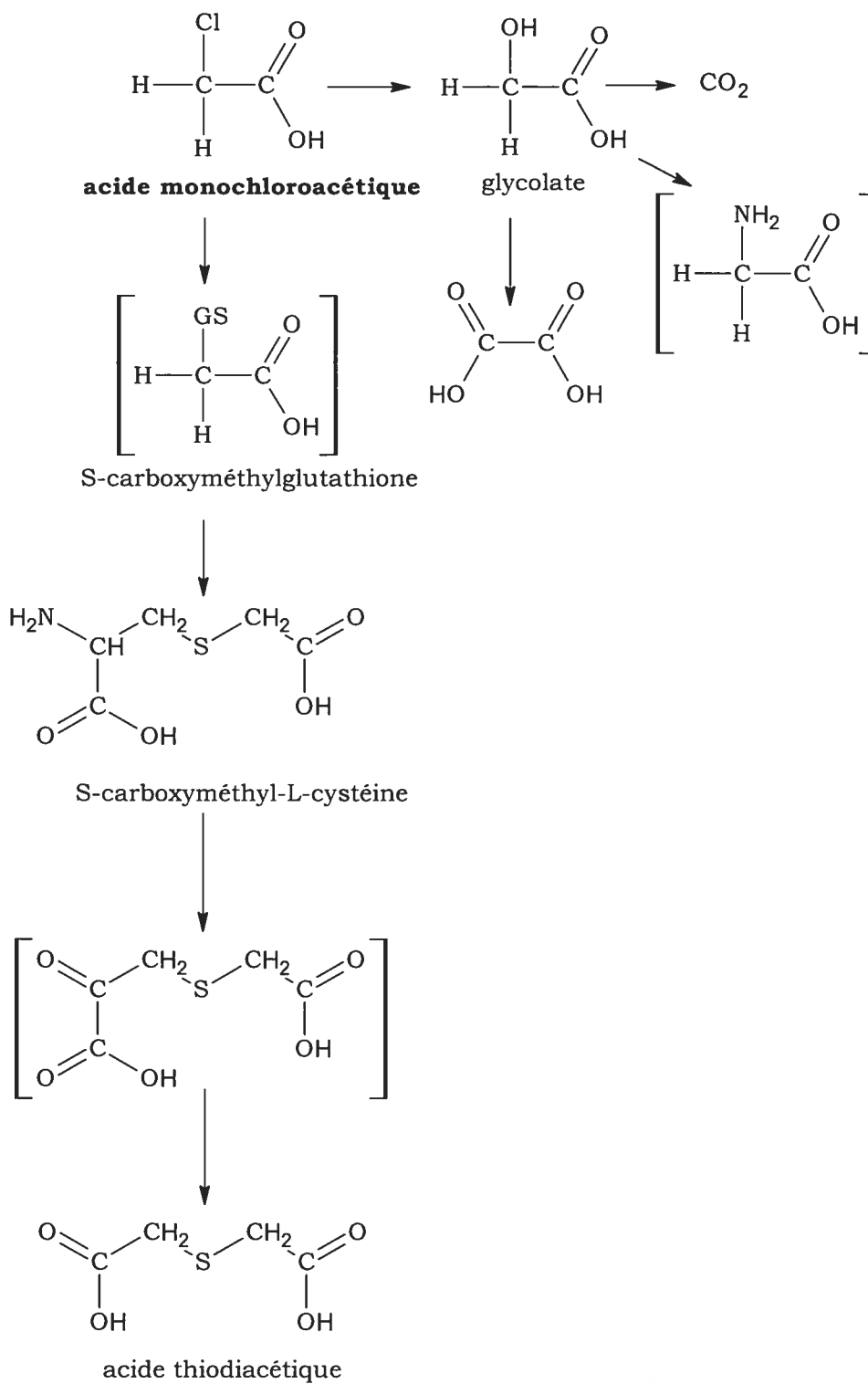


Figure 4. Étapes dans le métabolisme de l'acide monochloroacétique
(Adaptée de Yllner, 1971)



***Les composés en parenthèse n'ont pas été isolés.

1.3.3.4. Élimination

On rapporte que 50% du TCA, 2% du DCA et 6-22% du MCA sont éliminés dans l'urine sous forme inchangée (Yllner, 1971; Larson et Bull, 1992). Les métabolites du DCA et du MCA sont également éliminés dans l'urine. De plus, une grande proportion des acides chloroacétiques est éliminée sous forme de CO₂. On a démontré que 17 à 46% d'une dose de DCA était éliminée sous forme de CO₂ (James *et al.*, 1998). Cette proportion est plus faible pour les deux autres acides. On parle de 6-8% pour une dose initiale de TCA (Larson et Bull, 1992). De très faibles quantités d'acides chloroacétiques (< 3%) sont retrouvées dans la bile et/ou les fèces (Yllner, 1971; Larson et Bull, 1992; Toxopeus et Frazier, 1998). Par exemple, les études portant sur la biotransformation du trichloroéthylène en TCA ont démontré que jusqu'à 10% de TCA pouvait être excrété dans la bile sous forme conjuguée et ensuite rapidement réabsorbé dans l'intestin (Green et Prout, 1985).

Le TCA est lentement éliminé du compartiment sanguin et ce, pour plusieurs raisons. Premièrement, le TCA se lie fortement aux protéines plasmatiques. De plus, il peut être en partie réabsorbé par la vessie après la filtration glomérulaire (Hobara *et al.*, 1988). Enfin, la faible quantité excrétée dans la bile peut être réabsorbée via le cycle entérohépatique. Les demi-vies d'élimination du TCA et du DCA, mesurés dans le plasma de rat, sont respectivement de 5,8 h et 0,9 h, pour une dose de 100 mg/kg. Pour la même dose, la clairance sanguine est de 58 ml/kg.h pour le TCA, et de 820 ml/kg.h pour le DCA (Larson et Bull, 1992).

1.3.4. Impact sur la santé

1.3.4.1. Les études toxicologiques

Ce n'est qu'à la fin des années 80 que l'on s'est mis à se préoccuper des impacts sur la santé que pouvait engendrer l'exposition aux acides chloroacétiques dans l'eau potable. La majorité des études sur les acides

chloroacétiques mettent en évidence leur toxicité au niveau du foie. Les tableaux 11, 12 et 13 présentent les principales études chroniques, sub-chroniques, sub-aiguës et aiguës ayant porté sur les acides chloroacétiques. Les études chroniques démontrent principalement l'induction d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires chez les rongeurs. Dans tous les cas, les acides chloroacétiques étaient administrés dans l'eau de boisson et ce, pour la durée de vie des animaux (environ 2 ans). Aucune étude chronique n'a été réalisée avec le MCA. Ce composé est considéré non-cancérogène chez les animaux et les humains. L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis classe le DCA comme cancérogène probable chez les humains (USEPA, 2002d). Cette classification est inspirée par l'évidence de la cancérogénicité du DCA dans les études animales. Pour sa part, le TCA est considéré comme un cancérogène possible chez les humains étant donné que les études chroniques animales sont limitées (USEPA, 2002e). Dans les études subchroniques, les acides chloroacétiques étaient administrés durant 13 semaines (90 jours). Comme effet, on remarque principalement une augmentation du poids du foie et une modification des paramètres biochimiques du sang. Ces derniers sont souvent considérés comme de bons indicateurs de toxicité. Par exemple, une modification des concentrations de l'alanine amino transférase (ALAT) et de l'aspartate amino transférase (ASAT) laisse supposer un dérèglement dans le fonctionnement du foie. Deux études sub-chroniques ont également démontré une toxicité rénale se traduisant par une augmentation du poids des reins et une augmentation des concentrations d'azote uréique sanguin (BUN) (Mather *et al.*, 1990; Bryant *et al.*, 1992). L'étude de Bhat et collaborateurs (1991) a démontré qu'en plus des lésions au foie, les acides chloroacétiques sont capables d'induire des lésions au niveau des poumons. Cette étude a également révélé que le DCA entraîne des lésions au cerveau, une atrophie des testicules et une diminution des spermatoocytes chez le rat mâle. En ce qui concerne les effets d'une exposition à court terme, seules quelques études aiguës et subaiguës ont été réalisées. Une première étude, réalisée en 1941, a mesuré la LD50 pour chacun des trois acides chloroacétiques. Pour le MCA, le DCA et le TCA, les LD50 étaient respectivement de 0,076, 4,48 et

3,32 g/kg chez le rat et de 0,255, 5,52 et 4,97 g/kg chez la souris (Woodard *et al.*, 1941). Une seconde étude a démontré qu'une forte dose de MCA était neurotoxique (lésions au cerveau) (Berardi *et al.*, 1987). DeAngelo et collaborateurs (1989) ont évalué la possibilité que les acides chloroacétiques puissent induire une prolifération des peroxisomes lorsque administrés à fortes doses pendant 10-14 jours. Ils ont observé qu'effectivement le TCA et le DCA entraînent une prolifération des peroxysomes dans le foie des souris et des rats. Enfin, on a également remarqué, chez le poisson, des signes de toxicité au foie suite à une exposition au DCA pendant 4 semaines (McHugh Law *et al.*, 1998).

La génotoxicité des acides chloroacétiques a fait l'objet de quelques études. Une première étude, réalisée en 1988, a démontré que le TCA et le DCA étaient capables d'induire des ruptures de brins d'ADN de cellules de foie de souris et de rats (Nelson *et al.*, 1988). Quelques années plus tard, une étude a contredit ces résultats en révélant que les trois acides chloroacétiques étaient incapables d'induire des ruptures de brins d'ADN (Chang *et al.*, 1992). Contrairement au TCA, le DCA s'est avéré mutagène chez *Salmonella typhimurium* (De Marini *et al.*, 1994). Le DCA et le TCA ont induit des mutations en condition *in vitro* sur des lymphomes de cellules de souris (Harrington-Brock *et al.*, 1998). De plus, le TCA n'a engendré aucune aberration aux chromosomes ni sur des lymphocytes humains, ni sur des cellules de moelle osseuse de souris (Mackay *et al.*, 1995). Il y a très peu d'information à cet égard sur le MCA. En général, les études se contredisent et l'évidence de génotoxicité et de mutagénicité des acides chloroacétiques est relativement faible. Il est très probable que l'induction de tumeurs cancérogènes découle d'un mécanisme non-génotoxique. Le mécanisme serait plutôt épigénétique et impliquerait une hypométhylation de l'ADN (Tao *et al.*, 2000).

Tableau 11. Principales études chroniques ayant porté sur les acides chloroacétiques.

ACA étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
DCA, TCA	Souris (M)	Orale	2, 5 g/L (eau de boisson)	Adénomes et carcinomes hépatocellulaires	Herren-Freund et al., 1987
DCA, TCA	Souris	Orale	1, 2 g/L (eau de boisson)	Nodules, adénomes et carcinomes hépatocellulaires (mâle) ↑ poids du foie, nécrose, cytomégalie, ↑ glycogène ds hépatocytes (DCA) ↑ lipofuscine ds foie (TCA)	Bull et al., 1990
DCA	Souris (M)	Orale	0,05, 0,5, 3,5, 5 g/L (eau de boisson)	↓ poids corporel, ↑ poids du foie Néoplasmes et tumeurs au foie	DeAngelo et al., 1991
DCA	Souris (M)	Orale	93 mg/kg/j (eau de boisson)	↑ poids du foie Nécrose hépatocellulaire Tumeurs au foie	Daniel et al., 1992
DCA	Rat (M)	Orale	0,05, 0,5, 2,4 g/L (eau de boisson)	Nodules hyperplasiques au niveau du foie	Richmond et al., 1995
DCA	Rat (M)	Orale	0,05, 0,5, 1,6 g/L (eau de boisson)	Nodules hyperplasiques au niveau du foie Adénomes et carcinomes hépatocellulaires	DeAngelo et al., 1996
DCA, TCA	Souris (F)	Orale	2, 6,67, 20 mmol/L (eau de boisson)	↓ poids corporel, ↑ poids du foie Altération des hépatocytes Adénomes et carcinomes hépatocellulaires	Pereira, 1996
DCA	Souris (M)	Orale	0,05, 0,5, 1, 2, 3,5 g/L (eau de boisson)	Prolifération des peroxyosomes hépatiques Carcinomes hépatocellulaires	DeAngelo et al., 1999

Tableau 12. Principales études subchroniques ayant porté sur les acides chloroacétiques.

ACA étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
DCA	Rat (M)	Orale	50, 1110 mg/kg/j (eau de boisson)	↓ poids corporel ↓ activité de la transketolase ↑ faiblesses aux pattes de derrière	Stacpoole <i>et al.</i> , 1990
DCA, TCA	Rat (M)	Orale	50, 500, 5000 ppm (eau de boisson)	↑ poids du foie, reins ↑ activité oxydation peroxysomale hépatique ↑ ALAT, ALKP, ↓ protéines de sérum (DCA)	Mather <i>et al.</i> , 1990
MCA, DCA, TCA	Rat (M)	Orale	1,9 mM (MCA) 80,5 mM (DCA) 45,8 mM (TCA) (eau de boisson)	Lésions au foie et poumons Lésions au cerveau (DCA) Atrophie des testicules et diminution des spermocytes (DCA)	Bhat <i>et al.</i> , 1991
MCA	Souris Rat	Orale	25, 50, 100, 150, 200 mg/kg (souris) 30, 60, 90, 120, 150 mg/kg (rat)	↑ ALAT, ASAT, BUN (rat) ↑ poids du foie, reins (rat) ↑ cardiomyopathie (rat)	Bryant <i>et al.</i> , 1992
DCA, TCA	Souris	Orale	0,3, 1,0, 3,0 g/L (eau de boisson)	↑ poids du foie ↑ glycogène ds foie (DCA) ↓ glycogène ds foie (TCA) ↓ insuline ds sérum (DCA)	Kato-Weinstein <i>et al.</i> , 2001

Tableau 13. Principales études aiguës et subaiguës ayant porté sur les acides chloroacétiques.

ACA étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Toxicité	Source
MCA	Souris (M)	Orale	380 mg/kg	Lésions au cerveau : ↓ cellules de Purkinje Diminution des fonctions de la barrière hémato-encéphalique Rigidité des pattes avant	Berardi <i>et al.</i> , 1987
MCA, DCA, TCA	Souris (M) Rat (M)	Orale	1-3 g/L (MCA) 1-5 g/L (DCA, TCA) (eau de boisson)	↑ poids du foie (DCA, TCA-souris) Prolifération des peroxyosomes du foie (DCA-souris, rat) (TCA-souris)	DeAngelo <i>et al.</i> , 1989
TCA	Rat (M)	Orale	200 mg/kg (huile de maïs, eau)	Prolifération des peroxyosomes du foie	DeAngelo <i>et al.</i> , 1989
DCA	Poisson	Orale, branchiale, dermique	0,5, 2,0 g/L	Cytomégalie, kariomégalie Nécrose hépatocellulaire ↑ glycogène ds foie	McHugh <i>et al.</i> , 1998

1.3.4.2. Les études épidémiologiques

Les études épidémiologiques discutées précédemment (section 1.2.4.2.), comparant une eau chlorée et une eau non chlorée ou encore une eau de surface et une eau profonde, étudiaient indirectement les effets potentiels des acides chloroacétiques. Une seule étude épidémiologique a porté directement sur les effets reliés à la présence des acides chloroacétiques dans l'eau de consommation. Dans leur étude cas-témoins, Klotz et Pyrch (1999) ont évalué l'exposition aux acides chloroacétiques chez les femmes enceintes. Ils voulaient voir s'il y avait une association entre la présence d'acides chloroacétiques dans l'eau de consommation et les défauts du tube neural chez les nouveau-nés. Ils ont contrôlé l'âge, la race, l'ethnie, l'éducation, les soins prénataux et la consommation de vitamines afin que ces facteurs n'interfèrent pas dans l'interprétation des résultats. Ils ont également documenté les habitudes de vie telles que la prise de douches et la natation. Leurs résultats ont démontré qu'il n'y avait aucune association entre la présence d'acides chloroacétiques dans l'eau et les défauts du tube neural.

1.3.5. Les recommandations des niveaux d'exposition admissible

Au Canada, il n'y a actuellement aucune norme ou recommandation en ce qui concerne la présence d'acides chloroacétiques dans l'eau potable (Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable, 2002). Aux États-Unis, on a établi une recommandation pour la somme des concentrations des acides mono-, di-, et trichloroacétiques et des acides mono-, et dibromoacétiques. Le niveau maximal recommandé est de 60 µg/L pour les 5 acides haloacétiques (Environmental Protection Agency, 1998). Enfin, l'Organisation mondiale de la santé a établi des valeurs guides provisoires de 50 µg/L pour l'acide dichloroacétique et de 100 µg/L pour l'acide trichloroacétique. Il n'y a pas de recommandation pour l'acide monochloroacétique (WHO, 1996).

1.4. Les interactions

L'exposition environnementale à une seule substance chimique est plutôt rare. Nous sommes généralement exposés à plusieurs substances présentes au même moment dans l'environnement comme c'est le cas avec les sous-produits résultants de la désinfection de l'eau. Il y a donc une possibilité que ces substances interagissent ensemble. Il peut y avoir une interaction entre deux ou plusieurs substances dans le milieu comme tel (ex.: interaction chimique). Toutefois, dans le cadre du présent travail, seules les interactions entre les substances une fois qu'elles sont absorbées par les individus seront abordées. Ces interactions peuvent se produire soit dans la phase cinétique ou la phase dynamique.

1.4.1. Mécanisme d'action

1.4.1.1. Phase cinétique

Une substance peut modifier l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'excrétion d'une autre substance soit en modifiant à la hausse ou à la baisse l'efficacité de ces processus cinétiques. Les interactions métaboliques sont les plus fréquemment observées. Une augmentation du taux de métabolisme est causée par une induction enzymatique tandis qu'une diminution du taux de métabolisme est causée par une inhibition du métabolisme.

1.4.1.1.1. Induction enzymatique

Lors d'une induction enzymatique, il y a une augmentation de la quantité d'une ou de plusieurs enzymes (protéines). Les substances (ex.: polluants) sont métabolisées plus rapidement et leurs concentrations dans le sang sont alors diminuées. Ceci a pour effet de compromettre l'objectif thérapeutique de certains médicaments. En ce qui concerne l'induction du cytochrome P450, on reconnaît actuellement 5 classes d'inducteurs. Par exemple, le 3-méthylcholanthrène (3-MC), le phénobarbital, l'isoniazide, le pregnelone-16 α -carbonitrile (PCN) et l'acide chlofibrique induisent, respectivement, les

isoenzymes CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1, CYP3A1/2 et CYP4A1/2/3. Le mécanisme d'induction diffère selon les classes, le principe est toutefois similaire. Lors d'une induction, il y a accélération de la transcription du gène, soit en activant un récepteur responsable de la transcription, soit en désactivant une protéine responsable de la répression de la transcription. Il en résulte une synthèse de nouvelles protéines (Parkinson, 1996).

1.4.1.1.2. Inhibition métabolique

Le métabolisme d'une substance peut être inhibé de façon réversible ou irréversible. Il y a trois mécanismes possibles lors d'une inhibition réversible. Premièrement, il y a l'inhibition de type compétitive où l'inhibiteur fait concurrence au substrat pour le site actif d'une enzyme. La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme empêche le substrat de se lier. Une inhibition compétitive a pour effet d'augmenter la constante d'affinité (K_m). Deuxièmement, il y a l'inhibition de type non-compétitive où l'inhibiteur se lie à un site différent de celui liant le substrat. L'enzyme est inactivée lorsque l'inhibiteur est lié peu importe la présence ou non du substrat. Une inhibition non-compétitive diminue la concentration d'enzymes actives et ainsi réduit la vitesse maximale (V_{max}) du métabolisme. Enfin, il y a l'inhibition de type incompétitive où, comme dans le mécanisme précédent, l'inhibiteur se lie à un site différent de celui liant le substrat. Cependant, l'inhibiteur se lie seulement lorsque le substrat est lié également. Lors d'une inhibition incompétitive, il y a modification du V_{max} et du K_m .

Les inhibiteurs irréversibles se combinent avec un groupement fonctionnel sur l'enzyme qui est nécessaire à son activité ou le détruisent. Il y a formation d'une liaison covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme. Ces inhibiteurs, également appelés inhibiteurs suicidaires, sont non réactifs jusqu'à ce qu'ils se lient au site actif de l'enzyme. Lors de la réaction, au lieu d'être converti en produits « normaux », ils se lient et se transforment en composés très réactifs qui s'attaquent à l'enzyme (Lehninger *et al.*, 1993).

1.4.1.2. Phase dynamique

Il peut aussi avoir une interaction entre deux substances dans la phase dynamique, comme par exemple, une compétition pour un même récepteur cellulaire. De plus, deux substances ayant des effets opposés sur un tissu, un organe ou un système, peuvent causer une action antagoniste lorsque ces substances sont administrées à un individu en même temps. Par exemple, si on donne des barbituriques (atténuent l'activité du système nerveux) à un individu souffrant de convulsions causées par une intoxication au DDT (active le système nerveux), les symptômes seront diminués (Lehninger *et al.*, 1993). C'est aussi le cas pour plusieurs antidotes utilisés aujourd'hui en toxicologie clinique.

1.4.2. Résultats des effets

On dit qu'il y a synergie lorsque l'effet combiné de plusieurs substances est plus grand que la somme des effets de chaque substance individuelle (ex.: $1+2=5$). Il y a potentialisation lorsqu'une substance non-toxique pour un tissu ou un organe augmente la toxicité d'une seconde substance toxique (ex.: $0+3=8$). Enfin, il y a antagonisme lorsque l'effet combiné de plusieurs substances est plus petit que la somme des effets de chaque substance individuelle (ex.: $2+3=1$; $0+4=2$) (Mush, 1996).

1.4.3. Les études sur les interactions

Jusqu'à maintenant, les interactions entre les THM et les acides chloroacétiques ont été peu étudiées. Ce n'est qu'au début des années 90 que l'on a commencé à se préoccuper des interactions pouvant se produire entre les différents sous-produits retrouvés dans l'eau potable. Une première étude, effectuée chez le rat, a démontré que l'administration répétée (3 fois) de DCA et de TCA a pour effet d'augmenter la toxicité du chloroforme et que cet effet est spécifique à la femelle (Davis, 1992). Le DCA augmente la toxicité au niveau du foie et des reins tandis que le TCA affecte la toxicité des reins seulement. Puisque qu'on sait que le chloroforme est

métabolisé par le CYP2E1 et que cette enzyme est généralement plus prédominante chez les femelles, on a supposé que le CYP2E1 jouait un rôle important dans l'interaction entre les acides chloroacétiques et le chloroforme. On a effectivement remarqué que le DCA induit l'activité des enzymes CYP2E1 *in vitro* (Yang *et al.*, 1996). L'administration de DCA a pour effet d'augmenter le métabolisme *in vitro* du chloroforme et les métabolites du chloroforme forment davantage des liens covalents avec les protéines microsomales (contenant les CYP2E1) et les lipides (Yang *et al.*, 1997). En ce qui concerne la promotion de cancers, on a remarqué que le DCA entraîne la formation de tumeurs au niveau des reins lorsqu'il est administré avec le chloroforme et qu'il y a synergie entre les deux composés. Par contre, il y a antagonisme en ce qui concerne la formation de tumeurs au foie, la co-administration avec le chloroforme a pour effet de prévenir le cancer du foie généralement observé après une administration de DCA seul (Pereira *et al.*, 2001). Il a également été démontré que, lors de scénarios d'expositions répétées, le DCA est capable d'inhiber son propre métabolisme (Gonzalez-Leon *et al.*, 1997).

L'administration répétée de MCA augmente l'hépatotoxicité du chloroforme principalement chez les mâles et altère les fonctions rénales chez les femelles. Cependant, les doses administrées de MCA étaient deux fois plus élevées chez les mâles que chez les femelles (Davis *et al.*, 1992).

Un mélange de THM a été administré par voie orale à des souris femelles pendant 14 jours. Dans le mélange, les quatre THM étaient présents en proportions différentes correspondant au ratio observé dans des usines de traitement d'eau aux États-Unis (65 :24 :10 :1 pour CHCl_3 :BDCM :DBCM :TBM). Les résultats ont démontré que l'hépatotoxicité observée suite à l'administration d'un mélange de THM suit un modèle additif (Genning *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 2001). Cependant, des études chez le rat ont démontré que les quatre trihalométhanes interagissent au niveau métabolique, résultant en une diminution de leur taux de métabolisme et ainsi en une augmentation de leur concentration

sanguine (Da Silva *et al.*, 1999, 2000). Des études plus récentes ont évalué la cancérogénicité suite à l'administration, via l'eau de consommation, de sous-produits de désinfection, seuls et en mélange, chez des rats Long-Evans (Ekar). Ces rats étaient porteurs d'une mutation au niveau d'un gène suppresseur de tumeurs, le *Tsc2*, les rendant ainsi plus susceptibles de développer des tumeurs lors d'une exposition à des composés cancérogènes. Les sous-produits testés étaient le bromate de potassium, le 2-chloro-4-(dichlorométhyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), le chloroforme et le BDCM. Les résultats ont démontré que l'administration du mélange produisait autant de tumeurs au niveau des reins, de la rate et de l'utérus que l'administration des produits seuls. Les auteurs ont conclu que l'approche actuelle en analyse de risque, considérant l'addition des doses, pouvait possiblement surestimer le risque de cancer (Hooth *et al.*, 2002; McDorman *et al.*, 2003).

1.5. La modélisation

1.5.1. La modélisation toxicocinétique à base physiologique

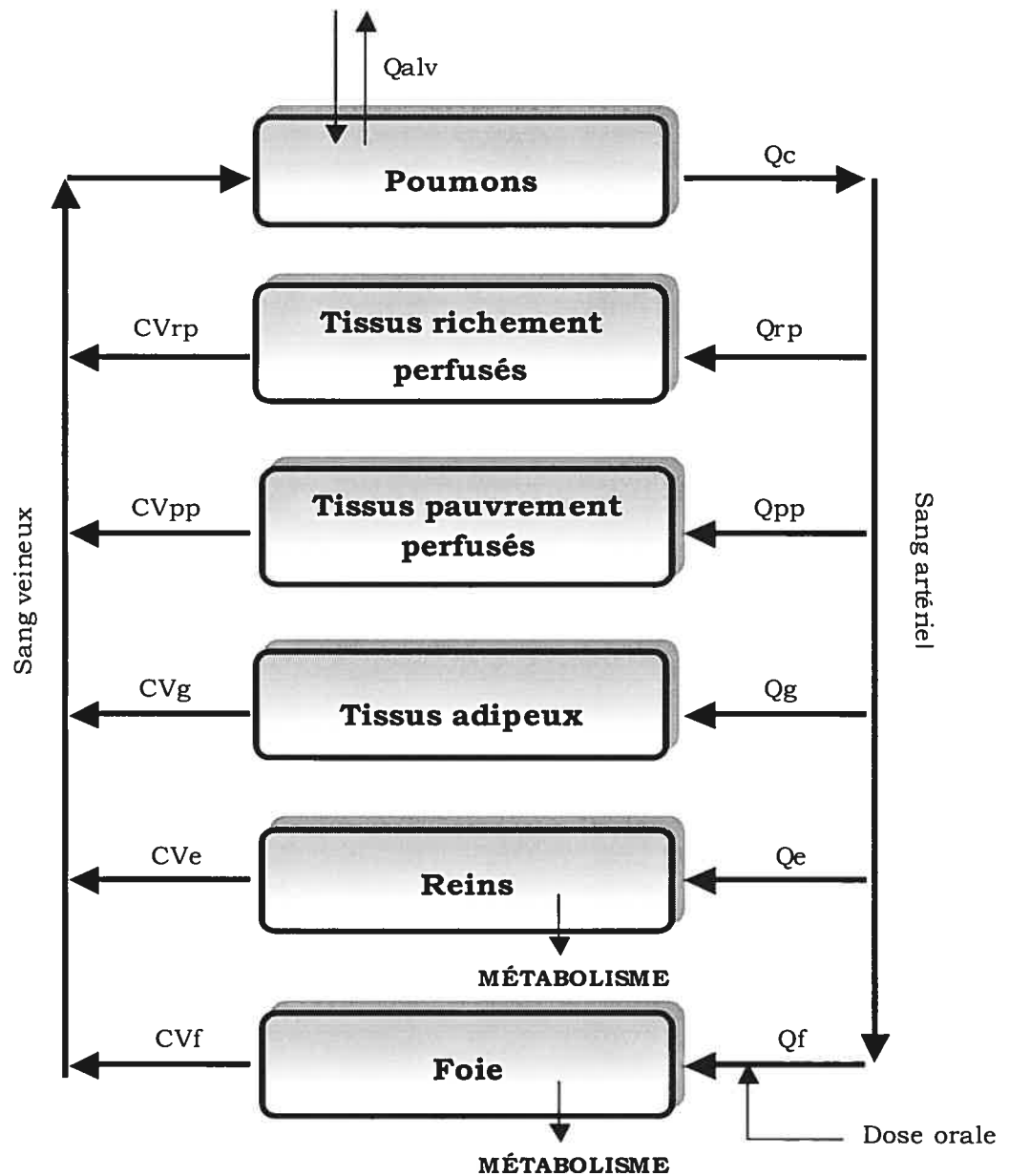
La modélisation toxicocinétique à base physiologique (TCBP) est une représentation simplifiée du mouvement d'une substance et/ou de ses métabolites dans l'organisme qui tient compte des caractéristiques anatomiques et physiologiques de cet organisme. Plus précisément, c'est une description mathématique des processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'élimination d'une substance basée sur l'interrelation quantitative entre certains paramètres de natures physiologiques, biochimiques et physico-chimiques. Les paramètres physiologiques varient en fonction de l'espèce étudiée (ex. : souris, rat, humain). Le débit sanguin et le taux de filtration glomérulaire sont des exemples de paramètres physiologiques. L'information sur les capacités de liaison et de métabolisme (V_{\max} , K_m) est cruciale dans l'élaboration des paramètres biochimiques. Ces derniers dépendent à la fois de l'espèce et de la substance étudiée. Enfin, la composition chimique des tissus est un déterminant majeur du mouvement d'une substance et du type de distribution d'une substance; à cet égard, les

coefficients de partage (sang :air et tissu :sang) sont des paramètres physico-chimiques importants qui sont spécifiques pour chaque substance (Krishnan et Andersen, 2001).

Un modèle TCBP consiste en plusieurs compartiments représentant les divers organes et tissus dans lesquels la substance se distribue. Ces différents compartiments sont inter-reliés par la circulation sanguine. La figure 5 est une représentation conceptuelle d'un modèle TCBP pour les trihalométhanes administrés par voie orale. Le foie est généralement considéré comme un compartiment unique en raison de sa capacité à biotransformer les trihalométhanes et les acides chloroacétiques. Les poumons sont requis pour les substances volatiles. Pour les substances lipophiles, on ajoute un compartiment représentant les tissus adipeux. Si certains tissus tels que les reins, le cerveau, le cœur et les testicules possèdent des caractéristiques similaires relatives à leur taux élevé de perfusion sanguine, ils peuvent être regroupés en un compartiment identifié comme tissus richement perfusés. Les tissus faiblement perfusés tels que les muscles et la peau peuvent être regroupés en tissus pauvrement perfusés (Krishnan et Andersen, 2001).

Puisque les organismes sont souvent exposés à plusieurs substances à la fois, comme c'est le cas avec les sous-produits de désinfection, il est impératif de pouvoir décrire les interactions possibles entre les composants d'un mélange. Pour ce faire, il faut d'abord être en mesure d'élaborer les modèles TCBP pour chacun des composants individuels du mélange. Ces modèles individuels sont ensuite reliés par une équation mathématique appropriée décrivant le type d'interactions entre les substances. Lors d'interactions métaboliques, les modèles sont reliés au niveau du foie. Par exemple, une modification de la vitesse maximale du métabolisme (V_{max}) et/ou de la constante d'affinité de Michaëlis-Menten (K_m) permet de décrire le mécanisme d'inhibition entre deux substances (tableau 14) (Andersen *et al.*, 1987; Tardif *et al.*, 1997; Haddad *et al.*, 1998).

Figure 5. Représentation conceptuelle d'un modèle TCBP pour les trihalométhanes administrés par voie orale (Adaptée de Da Silva *et al.*, 1999)



**CV fait référence à la concentration veineuse dans chacun des tissus, Q fait référence au débit sanguin dans chacun des tissus et Q_{alv} fait référence au débit pulmonaire.

Tableau 14. Représentation mathématique de la modification de la vitesse maximale du métabolisme (V_{max}) et de la constante d'affinité de Michaelis-Menten (K_m) lors d'une inhibition métabolique. (Tableau tiré de Haddad et Krishnan, 1998)

Mécanisme d'inhibition	Modification du K_m	Modification du V_{max}
Compétitive	$\alpha \cdot K_m$	Aucune
Incompétitive	K_m / α	V_{max} / α
Non-compétitive	Aucune	V_{max} / α

$\alpha = (1 + C_{vf}/K_i)$, où C_{vf} représente la concentration veineuse au foie pour l'inhibiteur et K_i représente la constante d'inhibition.

Les modèles TCBP permettent de prédire les concentrations d'une substance et/ou de ses métabolites dans les organes et tissus lors de divers scénarios d'exposition. Ils permettent également de faire des extrapolations entre les espèces (ex. : rat \rightarrow humain) ainsi qu'entre différentes doses (ex. : doses élevées toxiques \rightarrow doses faibles retrouvées dans l'environnement). Depuis quelques années, les modèles TCBP sont particulièrement utilisés en analyse de risque.

1.5.2. Les modèles TCBP publiés pour les trihalométhanes

De nombreux modèles TCBP ont été publiés pour le chloroforme. Très peu de modèles ont été développés pour le bromodichlorométhane, le dibromochlorométhane et le bromoforme. Le tableau 15 présente les principaux modèles TCBP développés pour les trihalométhanes. Corley et collaborateurs (1990) furent les premiers à développer un modèle TCBP pour le chloroforme. Leur modèle comprend les poumons, les tissus richement perfusés, les tissus pauvrement perfusés, le gras, les reins et le foie. Ces deux derniers tissus sont impliqués dans le métabolisme du chloroforme. Le gras ou tissu adipeux est décrit en tant que compartiment distinct en raison de la grande lipophilicité du chloroforme. Le modèle de Corley a été développé pour la souris, le rat et l'humain et décrit différentes voies d'administration.

Tous les autres modèles TCBP subséquents qui ont été publiés pour le chloroforme sont basés sur le modèle TCBP de Corley. Reitz et collaborateurs (1990) ont modifié le modèle de Corley afin d'y inclure un mécanisme pharmacodynamique : l'induction de la cytotoxicité au niveau du foie suite à l'exposition au chloroforme. Ils ont mesuré la quantité moyenne de métabolites du chloroforme liés de façon covalente aux macromolécules de foie ainsi que la cytotoxicité produite par les métabolites du chloroforme. Ils ont conclu que la cytotoxicité est une mesure plus appropriée dans l'évaluation de risque que la liaison aux macromolécules puisqu'elle reflète mieux la cancérogénicité induite au foie suite à l'exposition au chloroforme. D'autres auteurs ont également utilisé une version modifiée du modèle de Corley dans les études d'analyse de risque pour le chloroforme. Smith et collaborateurs (1995a) sont arrivés aux mêmes conclusions que Reitz. Pour leur part, Allen et collaborateurs (1996) ont évalué l'impact de la variabilité interindividuelle et des facteurs d'incertitude sur la prédiction du risque. Grâce au modèle TCBP, Delic et collaborateurs (2002) ont comparé le taux de métabolisme du chloroforme chez le rat avec celui chez l'humain. Ils ont ensuite fait une analyse Monte Carlo afin d'évaluer l'influence de la variabilité interindividuelle. Ils ont démontré que le métabolisme du chloroforme était plus élevé chez le rat que chez l'humain. Ils ont alors été en mesure d'affirmer que les limites d'exposition en milieu de travail établies pour le chloroforme sont sécuritaires pour l'humain; même les individus ayant un métabolisme très élevé seront protégés en ce sens qu'ils ne généreront pas des taux de métabolites toxiques assez élevés pour produire de la toxicité. Dans une étude similaire chez la souris, Smith et collaborateurs (1995b) ont démontré que les souris étaient plus susceptibles que les humains quant aux effets toxiques du chloroforme. Une concentration de chloroforme supérieure à 10 ppm serait nécessaire pour induire une toxicité au niveau du foie chez l'humain. Enfin, une étude a démontré qu'il était important de bien décrire le système respiratoire dans les modèles TCBP lors d'exposition par inhalation puisque certaines substances peuvent être métabolisées *in situ* dans le système respiratoire et les poumons. Les concentrations de chloroforme nécessaires pour causer de

la toxicité au niveau de la cavité nasale sont inférieures à celles causant de la toxicité rénale ou hépatique (Sarangapani *et al.*, 2002).

Puisque le chloroforme est un composé volatil présent dans l'eau, plusieurs modèles TCBP ont été publiés chez l'humain afin de caractériser les expositions dermales et respiratoires suite à diverses activités quotidiennes telles que la douche, le bain ou la natation (McKone, 1993; Roy *et al.*, 1996; Corley *et al.*, 2000; Lévesque *et al.*, 2000; Lévesque *et al.*, 2002). Georgopoulos et collaborateurs (1994) ont utilisé un modèle TCBP afin de reconstruire des expositions multiples à court terme. La performance du modèle a été évaluée à l'aide de données relatives aux concentrations de chloroforme dans l'air ambiant et dans l'air exhalé suite à une douche ou à une baignade en piscine.

Lilly et collaborateurs (1997b, 1998) ont développé un modèle TCBP pour le bromodichlorométhane comprenant les mêmes compartiments que le modèle de Corley. Leurs études ont été effectuées chez le rat mâle exposé au BDCM par voies orale et respiratoire. Finalement, les informations obtenues grâce aux modèles de Corley et de Lilly ont permis à Da Silva et collaborateurs (1999, 2000) de développer un modèle généralisé chez le rat mâle et ce, pour les quatre trihalométhanes suite à une exposition par voie orale.

Tableau 15. Principaux modèles TCBP développés pour les trihalométhanes.

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Simulation au niveau des tissus	Source
Chloroforme	Souris (M) Rat (M)	Inhalation	10, 89, 366 ppm (souris) 93, 356, 1041 ppm (rat)	Qté métabolisée, qté accumulée, qté exhalée, liaison aux protéines, liaison aux macromolécules de foie et reins	Corley <i>et al.</i> , 1990
Chloroforme	Souris (M) Rat (M) Humain	Orale	60 mg/kg (souris et rat) 7, 14, 8,33, 15,4 mg/kg (humain)	Qté métabolisée et qté exhalée	Corley <i>et al.</i> , 1990
Chloroforme	Souris (M)	Intra-péritonéale	51, 297, 445, 714, 741 mg/kg	Liaison aux macromolécules de foie et reins	Corley <i>et al.</i> , 1990
Chloroforme	Humain	Inhalation Dermale	120 µg/m ³ (10 min. ds douche) 100 µg/m ³ (air) et 150 µg/l (eau) (30 min. ds piscine)	Air exhalé	Roy <i>et al.</i> , 1996
BDCM	Rat (M)	Inhalation	50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1200, 1600, 3200 ppm (4h)	Concentration de Br dans plasma, [] de BDCM dans chambre et qté métabolisée	Lilly <i>et al.</i> , 1997b
BDCM	Rat (M)	Orale	50, 100 mg/kg (huile de maïs et émulsion)	Sang veineux, reins, foie, [] de BDCM dans chambre, [] d'ions bromés Br et taux de métabolisme	Lilly <i>et al.</i> , 1998
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Rat (M)	Orale	0,25 mmol/kg	Sang	Da Silva <i>et al.</i> , 1999

Tableau 15. (suite)

THM étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Simulation au niveau des tissus	Source
Chloroforme, BDCM, DBCM, TBM	Rat (M)	Orale	0,5 mmol/kg	Sang	Da Silva <i>et al.</i> , 2000
Chloroforme	Humain	Dermale	39,5 - 97 ppb	Air exhalé	Corley <i>et al.</i> , 2000
Chloroforme	Humain	Inhalation Dermale	18 - 80 µg/l (eau de piscine) 78 - 329 µg/m ³ (air)	Air alvéolaire, liaison aux macromolécules de foie et reins	Lévesque <i>et al.</i> , 2000
Chloroforme	Humain (M)	Inhalation (douche+air intérieur) Orale	147, 259 µg/l (douche), 9, 28 µg/m ³ (air intérieur) 25, 54 µg/l (eau consommée)	Air alvéolaire, liaison aux macromolécules de foie et reins	Lévesque <i>et al.</i> , 2002
Chloroforme	Rat	Inhalation	5, 50, 100 ppm (1h)	Sang veineux et qté métabolisée	Evans <i>et al.</i> , 2002

1.5.3. Les modèles TCBP publiés pour les acides chloroacétiques

Il existe très peu de modèles TCBP pour les acides chloroacétiques. Aucun modèle TCBP n'est disponible pour l'acide monochloroacétique. Les modèles TCBP décrits pour l'acide trichloroacétique et l'acide dichloroacétique sont tous issus d'études sur le trichloroéthylène (TCE). Le tableau 16 présente les principaux modèles TCBP développés pour ces deux composés. Ils ont été développés pour la souris, le rat et l'humain. La plupart comprennent quatre compartiments, soit le foie, les poumons, les reins et le reste du corps. Dans chacun des cas, le modèle est relié, au niveau du foie, à un modèle TCBP développé pour le TCE puisque celui-ci est métabolisé dans le foie en différents composés dont le TCA et le DCA. De plus, comme le foie est un organe critique pour l'induction de tumeurs par le TCA et le DCA, il est essentiel de le considérer comme un compartiment distinct. Les reins sont également décrit en un compartiment distinct en raison de leur fonction d'excrétion. Pour ce qui est des poumons, ils représentent la voie d'exposition lors d'études sur l'inhalation du TCE et on considère qu'ils jouent un rôle important dans le métabolisme du TCE (Abbas *et al.*, 1997). Stenner et collaborateurs (1998) ont développé un modèle un peu plus sophistiqué pour le TCA. Ils voulaient examiner l'effet de la re-circulation entéro-hépatique pour les différents métabolites du TCE. Des études ont démontré que les concentrations maximales de TCA sont observées 12 heures après l'administration d'une dose orale de trichloroéthylène (Stenner *et al.*, 1997). Leur modèle comprend donc un compartiment biliaire et un compartiment décrivant le tractus gastro-intestinal relié au foie afin de simuler la re-circulation entéro-hépatique. Les autres tissus inclus dans le modèle sont, le sang, le gras, les tissus pauvrement perfusés et ceux richement perfusés.

De nombreux modèles TCBP ont été publiés pour le TCE et ses métabolites. Cependant, dans la plupart des cas, la cinétique du TCA a été décrite par un modèle classique à un compartiment. On considère que le TCA est le métabolite responsable de l'induction de cancer au foie suite à l'exposition au TCE (Fisher *et al.*, 1991). Fisher et collaborateurs (1989) ont été les

premiers à publier un modèle TCBP pour le TCE et son métabolite principale, le TCA. Leur modèle a été développé chez la rate enceinte exposée au TCE par inhalation, par gavage et par l'eau de breuvage. Ils ont relié au foie un compartiment décrivant la distribution du TCA. Ils ont ensuite été en mesure de prédire les concentrations plasmatiques de TCA chez la rate enceinte et son fœtus suite à l'exposition au TCE. En 1990, ils ont publié le même type de modèle mais cette fois-ci chez la rate qui allaite, et chez ses ratons. Ils ont prédit les concentrations sanguines de TCA chez les mères, les concentrations de TCA dans le lait maternel et les concentrations plasmatiques de TCA chez les ratons suite à l'exposition au TCE par différentes voies (Fisher *et al.*, 1990). Ce même modèle a été repris par différents auteurs et a permis de prédire les concentrations plasmatiques et l'excrétion urinaire cumulée du TCA chez la souris, le rat et l'humain exposés par inhalation ou par voie orale à différentes concentrations de TCE (Fisher *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1993; Clewell *et al.*, 2000). Fisher et Allen (1993) ont utilisé ce même modèle TCBP pour faire une analyse de risque. Ils ont estimé la quantité de TCE métabolisé et la concentration systémique de TCA suite à différents scénarios d'exposition. Ils ont ensuite utilisé un modèle à multi-étapes linéarisées (LMS) afin de prédire les concentrations de TCE nécessaires pour entraîner un risque de cancer du foie de 1/1 000 000. Clewell et collaborateurs (1995, 2000) ont également estimé les concentrations de TCE nécessaires pour entraîner un risque de cancer de 1/1 000 000 non seulement pour le foie mais également pour les poumons et les reins, et ce, à partir de doses obtenues à l'aide d'un modèle TCBP pour le TCE et ses métabolites.

Tableau 16. Principaux modèles TCBP développés pour les acides chloroacétiques.

ACA étudié	Espèce	Voie d'exposition	Dose	Simulation au niveau des tissus	Source
TCA, DCA	Souris (M)	Orale	300, 600, 1200, 2000 mg/kg de TCE (huile de maïs)	Sang (TCA, DCA) Foie (TCA, DCA) Excrétion urinaire (TCA)	Abbas et Fisher, 1997
TCA	Rat	Orale Intra-veineuse	100, 200 mg/kg (orale) 12, 48, 100, 192 mk/kg (i.v.)	Sang Liaison aux protéines sanguines	Stenner <i>et al.</i> , 1998
TCA	Humain (M,F)	Inhalation	50 et 100 ppm de TCE (4h)	Sang Excrétion urinaire	Fisher <i>et al.</i> , 1998
TCA, DCA	Souris (M)	Inhalation	100 et 600 ppm de TCE (4h)	Sang (TCA, DCA) Foie et reins (TCA, DCA) Poumons (TCA)	Greenberg <i>et al.</i> , 1999

1.6. L'analyse du risque

1.6.1. L'approche actuelle pour les mélanges

L'analyse de risque réfère à l'estimation de la probabilité et de l'ampleur de l'incidence d'effets néfastes pour l'humain exposé à une ou plusieurs substances chimiques. La démarche de l'analyse de risque comprend quatre étapes : (i) l'identification du danger, (ii) l'évaluation de l'exposition, (iii) l'évaluation de la dose-réponse et (iv) la caractérisation du risque. Pour les mélanges de composés non-cancérogènes, l'approche actuelle en analyse de risque considère l'additivité des doses. Cette approche suppose que (i) chaque composé du mélange produit le même effet par le même mécanisme et que (ii) les composés diffèrent uniquement par leur puissance, leur courbe dose-réponse étant parallèle. Deux méthodes peuvent être utilisées dans cette approche actuelle, soit l'indice de danger et le facteur d'équivalence toxique (ATSDR, 2001). L'indice de danger (ID) sert à évaluer les effets non-cancérogènes d'un mélange en se basant sur les données des composés individuels. L'équation utilisée pour cette méthode est la suivante :

$$ID = \frac{D_1}{RfD_1} + \frac{D_2}{RfD_2} + \frac{D_3}{RfD_3} + \dots + \frac{D_n}{RfD_n} \quad (1)$$

où, D est la dose d'exposition d'un composé du mélange et RfD représente la dose de référence de ce même composé. On pourrait également utiliser la concentration maximale acceptable (CMA) de Santé Canada. En milieu de travail, on utilise une approche semblable pour les valeurs d'exposition moyennes pondérées (VEMP) établie par le gouvernement du Québec. Bref, on divise la dose d'exposition par le niveau d'exposition considéré acceptable ou sécuritaire par l'agence responsable de faire l'analyse de risque (ATSDR, 2001). Si l'indice de danger (ID) (Rm pour les VEMP) est supérieur à l'unité, cela signifie que l'exposition au mélange entraîne un certain risque pour la santé des individus.

Lorsque les composés du mélange sont des congénères ou des isomères, il est possible d'utiliser la méthode du facteur d'équivalence toxique (Krishnan *et al.*, 1997). On mesure la valeur du facteur d'équivalence toxique (TEF) pour un composé de la façon suivante :

$$TEF = \frac{\text{Puissance de l'isomère donné}}{\text{Puissance de l'isomère de référence}} \quad (2)$$

Pour les mélanges, l'équation utilisée est la suivante :

$$TEQ = \sum_{i=1}^n C_i \times TEF_i \quad (3)$$

où, TEQ est le facteur d'équivalence toxique pour le mélange, C_i est la concentration d'exposition pour le composé i et TEF_i est la valeur du facteur d'équivalence toxique pour ce même composé du mélange.

Pour les mélanges de composés cancérogènes, l'approche actuelle en analyse de risque considère également l'additivité des réponses. Elle est basée sur les mêmes principes que l'addition des doses. Elle est toutefois utilisée pour des composés ayant une courbe dose-réponse linéaire ou encore sans seuil. L'équation utilisée pour cette approche est la suivante :

$$P(D) = \sum_{i=1}^n q^*_i \times D_i \quad (4)$$

où, $P(D)$ représente le risque, q^*_i est le risque unitaire (ou encore la pente de la courbe dose-réponse) pour le composé i et, D_i est la dose d'exposition pour ce même composé du mélange.

Le gros désavantage de l'approche actuelle en analyse de risque est qu'elle ne tient pas compte des interactions possibles entre les différents composés du mélange.

1.6.2. Une nouvelle approche considérant les interactions toxicocinétiques

Une nouvelle approche en analyse de risque veut qu'il soit beaucoup plus précis d'utiliser les concentrations tissulaires au lieu des concentrations d'exposition. Dans un mélange, il est possible que les différents composés du mélange interagissent ensemble. Lors d'une interaction toxicocinétique, il y a de forte probabilité que la concentration tissulaire d'une ou plusieurs substances soit modifiée. Tel que mentionné auparavant, les interactions entre les divers composés d'un mélange peuvent être simulées à l'aide de modèles toxicocinétiques à base physiologique. Ces modèles peuvent donc mesurer les changements dans les concentrations tissulaires dus aux interactions. Dans la nouvelle approche en analyse de risque, les équations précédentes peuvent être légèrement modifiées afin de considérer les interactions toxicocinétiques (Haddad *et al.*, 2001).

Par exemple, pour les composés non-cancérogènes ou toxiques systémiques, on parle alors d'un indice biologique de danger (IBD) :

$$IBD = \sum_{i=1}^n \frac{CT_i}{CT_i \text{ valeursécuritaire}} \quad (5)$$

où, CT_i est la concentration tissulaire du composé i en mélange pouvant être prédite avec la modélisation TCBP.

Pour les composés cancérogènes, l'équation basée sur la nouvelle approche devient alors :

$$P(CT) = \sum_{i=1}^n q^*_{ti} \times CT_i \quad (6)$$

où, q^*_{ti} est le potentiel cancérogène basé sur la concentration tissulaire et CT_i est la concentration tissulaire du composé i en mélange pouvant être prédite avec le modèle TCBP qui tiendra compte des interactions toxicocinétiques.

Cette approche n'a jamais été appliquée pour les THM à cause du manque de modèles et de données expérimentales concernant le modification du CTi pendant une exposition mixte.

CHAPITRE DEUX

LE PROJET DE RECHERCHE

2. LE PROJET DE RECHERCHE

2.1. La problématique

La désinfection de l'eau potable est essentielle afin de prévenir la transmission des maladies dites hydriques. La chloration de l'eau est actuellement le procédé de désinfection le plus utilisé lequel entraîne toutefois la formation de sous-produits de désinfection (SPD) toxiques. Parmi ces SPD, on retrouve notamment les trihalométhanes (THM) et les acides chloroacétiques. Des études toxicologiques ont démontré que les THM et deux des acides chloroacétiques possèdent un potentiel cancérigène (Jorgenson *et al.*, 1985; Dunnick *et al.*, 1985, 1987; NTP, 1989; Bull *et al.*, 1990; DeAngelo *et al.*, 1996). De plus, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une association entre l'exposition à l'eau chlorée et le développement du cancer de la vessie (Cantor *et al.*, 1987, 1998; McGeehin *et al.*, 1993; King *et al.*, 1996). Actuellement, Santé Canada considère uniquement la présence d'un des quatre THM, le chloroforme, pour établir des normes sécuritaires d'exposition aux SPD pour les humains. Or des études ont démontré que les niveaux d'acides chloroacétiques sont souvent égaux et parfois même supérieurs à ceux des THM (Williams *et al.*, 1997). Il est donc essentiel de considérer non seulement le chloroforme mais également l'ensemble des THM et des acides chloroacétiques dans l'établissement des concentrations maximales acceptables de SPD pouvant être tolérées dans l'eau potable.

Une étude animale récente a démontré que l'exposition orale à un mélange de THM pouvait conduire à des interactions toxicocinétiques pouvant affecter leur toxicité (Da Silva *et al.*, 1999, 2000). Aucune information n'est actuellement disponible concernant l'influence d'une exposition simultanée de THM et d'acides chloroacétiques, en mélange, sur leur profil toxicocinétique respectif.

2.2. Objectifs de la recherche

L'objectif général de la recherche est de caractériser la toxicocinétique des trihalométhanes et des acides chloroacétiques administrés sous forme de mélange chez le rat.

Les objectifs spécifiques de la recherche sont les suivants : (i) l'évaluation de l'influence de l'administration des acides chloroacétiques sur la cinétique des THM (et vice-versa) sous des conditions *in vivo* (Chapitre 3), (ii) l'identification du mécanisme de l'interaction entre les THM et les acides chloroacétiques sous des conditions *in vitro* (Chapitre 4), et enfin (iii) le développement de modèles toxicocinétiques à base physiologique qui serviront à simuler/prédire la cinétique des THM et des acides chloroacétiques lorsque administrés sous forme de mélanges complexes tels qu'on les retrouve dans l'eau potable (Chapitre 5).

2.3. Organisation de la thèse

Dans un premier temps, nous allons discuter de l'interaction entre les trihalométhanes et les acides chloroacétiques lorsqu'ils sont administrés sous forme de mélanges chez le rat (Chapitre 3). Étant donné leur présence simultanée dans l'eau potable, il est fort probable que les THM et les acides chloroacétiques interagissent ensemble résultant ainsi en une modification de leur profil toxicocinétique et en une augmentation ou une diminution de leur toxicité. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons administré des mélanges binaires, contenant un THM et un acide chloroacétique, à des rats. Par la suite, nous avons administré des mélanges plus complexes contenant plusieurs THM et un acide chloroacétique. L'administration intra-veineuse a été utilisée afin de (i) éliminer la variabilité inter-individuelle que peut entraîner le processus d'absorption lors d'une administration orale et (ii) éliminer la possibilité que les composantes du mélange interagissent ensemble lors de l'absorption. Dans un premier temps, l'influence des acides chloroacétiques sur la cinétique des THM ainsi que l'influence des THM sur leur propre cinétique ont été évaluées (Article I).

Ensuite, nous avons étudié l'influence des THM sur la cinétique des acides chloroacétiques (Article II) en omettant l'acide monochloroacétique puisque cette substance est considérée non-cancérogène, est faiblement présente dans l'eau et ne persiste que très brièvement dans le corps humain.

Une fois que les interactions entre les THM et les acides chloroacétiques ont été caractérisées *in vivo*, nous avons, dans un second temps, caractérisé la nature des interactions métaboliques sous des conditions *in vitro* en utilisant des microsomes (Chapitre 4). L'hypothèse était que les THM et certains acides chloroacétiques, notamment le TCA, sont des substances métabolisées par le cytochrome P450. L'approche a consisté à évaluer la cinétique de transformation *in vitro* des THM seuls, en mélange quaternaire et, en mélange binaire avec un acide chloroacétique (Article III). Cette étude visait à déterminer si la présence du TCA, du DCA, du MCA ou encore des trois autres THM a pour effet d'inhiber ou encore d'induire la biotransformation des THM en milieu *in vitro*. De plus, l'approche Lineweaver-Burk a été utilisée afin d'identifier le mécanisme d'inhibition (compétitive, non compétitive ou incompétitive) observé dans les mélanges binaires formés d'un THM et d'un acide chloroacétique.

Le Chapitre 5 présente les résultats d'une étude de modélisation toxicocinétique à base physiologique des THM seuls et en mélange. La méthodologie a consisté premièrement à développer un modèle toxicocinétique à base physiologique chez le rat exposé à chacun des THM par voie intra-veineuse. Les quatre modèles ont ensuite été inter-connectés afin de décrire le mécanisme d'interaction et ont servi à modéliser l'exposition à un mélange des quatre THM (Article IV). Une approche simplifiée est proposée pour modéliser l'impact causé par les acides chloroacétiques sur les THM.

Finalement, dans le Chapitre 6, une discussion générale est présentée suivie d'une analyse de risque chez l'humain exposé à un mélange de THM. La méthodologie a consisté à mettre en application l'approche basée sur la

concentration tissulaire (Haddad *et al.*, 2001). Ainsi, le risque de développer un cancer suite à l'exposition aux THM a été évalué en considérant les interactions possibles entre les THM lorsqu'ils sont présents dans l'eau de consommation.

CHAPITRE TROIS

ÉVALUATION *IN VIVO* DES INTERACTIONS TOXICOCINÉTIQUES ENTRE
LES TRIHALOMÉTHANES ET LES ACIDES CHLOROACÉTIQUES.

CHAPITRE TROIS

ARTICLE I

Abstract

Chloroacetic acids [monochloroacetic acid (MCA), dichloroacetic acid (DCA) and trichloroacetic acid (TCA)] and trihalomethanes [THMs: chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM) and bromoform (TBM)] are common by-products of the chlorination of drinking water. The purpose of this study was to evaluate the influence of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of trihalomethanes in the male Sprague-Dawley rat. In the first series of studies, groups of five animals were given, by intravenous injections, a single dose of 0.125 mmol/kg of one of the four THMs. Additional groups received a binary mixture containing 0.125 mmol/kg of a THM plus 0.125 mmol/kg of a chloroacetic acid. The venous blood concentrations of unchanged THMs were measured by head-space gas chromatography from 5 min. to 6 hr post-administration. The area under the blood concentration versus time curves (AUCs) of CHCl_3 , BDCM and DBCM were increased by a factor of 3.5, 1.6 and 2, respectively, by co-administration of TCA. DCA co-administration resulted in an increase in the AUC of DBCM (x 2.5) and TBM (x 1.3) whereas MCA modified the C_{max} (x 1.5) and AUC (x 1.8) of BDCM and the AUC of DBCM (x 2.5). In the second series of experiments, animals received either a single dose of 0.03125 mmol/kg of one of the four THMs, a mixture containing 0.03125 mmol/kg of the four THMs (total dose = 0.125 mmol/kg) or a mixture containing 0.03125 mmol/kg of the four THMs plus 0.125 mmol/kg of either TCA or DCA. Results indicated that the AUCs of CHCl_3 , BDCM, DBCM and TBM were increased during co-administration compared to single administrations (+2.5 fold). Combined administration of the four THMs with TCA, and not DCA, resulted in an increase of the AUCs of THMs (CHCl_3 : x 11.7; BDCM, DBCM and TBM: x 3.9) and an increase in the C_{max} of CHCl_3 (x 1.9). Overall, these results indicate that, at the dose levels tested in the present study, TCA alters the blood concentration profiles of THMs.

Introduction

Chlorination has been the most widely used disinfection process for drinking water. The reaction of chlorine with naturally-occurring organic matter in water (e.g., fulvic and humic acids) results in the formation of by-products (Rook, 1974; Singer and Chang, 1989). The major identifiable disinfection by-products (DBPs) are trihalomethanes [THMs: chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM) and bromoform (TBM)] and chloroacetic acids [monochloroacetic acid (MCA), dichloroacetic acid (DCA) and trichloroacetic acid (TCA)]. Since 1993, the Canadian guideline has been 100 ppb ($\mu\text{g/L}$) for total THMs (Health Canada, 1993). This guideline has been established based exclusively on chloroform, assuming that it is the only DBP of concern.

A published Health Canada survey has shown that total chloroacetic acid levels equalled or exceeded total THM levels (Williams *et al.*, 1997). Mean concentrations of DCA measured in this survey ranged from 4.6 to 15.6 $\mu\text{g/L}$ in winter to 11.4 to 19.0 $\mu\text{g/L}$ in summer with concentrations as high as 120.1 $\mu\text{g/L}$ recorded at one site. The corresponding TCA concentrations were 4.1 to 56.7 $\mu\text{g/L}$ in winter to 21.4 to 48.9 $\mu\text{g/L}$ in summer, and a peak of 473.1 $\mu\text{g/L}$ for one of the water supplies sampled. MCA was present at lower levels than TCA and DCA. Total THM concentrations were 6.8 to 33.3 $\mu\text{g/L}$ in winter and 31.2 to 66.7 $\mu\text{g/L}$ in summer with a peak of 342.4 $\mu\text{g/L}$ recorded at one site in the summer (Williams *et al.*, 1997).

Many epidemiological studies are suggestive of the possible association between DBPs and bladder and colorectal cancer (Cantor, 1997). More recently, the attention has shifted towards the potential adverse reproductive effects of DBPs (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). In addition, several laboratory studies have been focusing on the evaluation of the need to consider the combined effects of DBPs in the risk assessment process (Davis, 1992; Davis and Berndt, 1992; Simmons *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 1999, 2000). Whereas Davis (1992) reported that repeated administrations

of TCA and DCA increased the toxicity of CHCl_3 , Davis and Berndt (1992) observed MCA-induced alterations in the distribution of CHCl_3 during combined exposures. Da Silva *et al.* (1999, 2000) showed that simultaneous oral administration of THMs resulted in an increased blood levels of THMs compared to single administration.

The interactions among DBPs may be the consequence of competition for enzymatic metabolism sites. For example, the THMs are metabolized to carbon monoxide by cytochrome P450 isozymes (Ahmed *et al.*, 1977). The most probable isoform involved in the metabolism of chloroform and BDCM is CYP2E1 (Nakajima *et al.*, 1995; Testai *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 1997). This same isoform has also been suspected to be involved in the metabolic interaction between chloroacetic acids and CHCl_3 (Davis, 1992), even though the mechanism has not been fully understood. Yang and Davis (1997) reported that DCA pre-treatment resulted in an enhancement of chloroform metabolism under *in vitro* conditions. *In vivo* evaluation of metabolic or pharmacokinetic interactions between THMs and chloroacetic acids (MCA, DCA and TCA) has not been undertaken previously.

The objective of the present study was therefore to evaluate whether chloroacetic acids influence the pharmacokinetics of THMs in male Sprague-Dawley rats, following co-administration by the intravenous route.

Materials and Methods

Chemicals

CHCl₃, BDCM, DBCM, TBM, MCA, DCA, TCA and methanol (>98% purity) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alkamuls® was obtained from Rhodia (Cranbury, NJ). Sodium pentobarbital was obtained from Abbott Laboratories (Toronto, Ontario, Canada) while buprenorphine HCl was obtained from Reckitt & Colman Pharmaceuticals Inc. (Richmond, VA). Finally, dextrose (5%) was purchased from CDMV (Montreal, Quebec, Canada) and sodium heparin was purchased from Wyeth-Ayerst (Saint-Laurent, Quebec, Canada).

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 240-260 g were purchased from Charles River (St-Constant, Quebec, Canada) and housed in a facility with a 12-hr light/dark cycle. Food and tap water were given *ad libitum*. The concentration of DBPs in tap water was not measured and it was assumed not to contribute significantly to the total exposure dose received by the animals during the study.

Dosing procedure

One week before treatments, rats were fitted individually with a femoral vein cannula. After receiving a subcutaneous injection of buprenorphine HCl (0.5 mg/kg), rats were anesthetized with sodium pentobarbital (36 mg/kg i.p.). A polyethylene catheter (PE-10: 4.5 cm, PE-50: 18 cm) was inserted into the femoral vein. The cannula was exteriorised in the back of the animals, between the shoulder blades, filled with a dextrose (5%) and heparin solution (42 IU/mL) and fixed by two clips (9 mm). Patency of the cannula was ensured by flushing with a heparinized dextrose solution every two days. The animals were used in the experiments after one week acclimation period. All procedures were approved by the Institutional

Animal Care and Use Committee (University of Montreal, Canada). Rats weighed 255.9 ± 10.4 g at the time of DBP administrations. All intravenous injections were always performed at 9:00 a.m. The volume injected was 1 mL/kg in all cases. All chemicals were dissolved in an aqueous solution of Alkamuls® (10% v/v) and then shaken in order to obtain a homogeneous mixture.

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of individual THMs

Groups of five animals were given, by intravenous injections in the femoral vein cannula, a single dose of 0.125 mmol/kg of one of the four THMs (CHCl₃, BDCM, DBCM or TBM). Additional groups received a binary mixture of 0.125 mmol/kg of a chloroacetic acid (MCA, DCA or TCA) plus 0.125 mmol/kg of a THM (CHCl₃, BDCM, DBCM or TBM) (total dose of 0.25 mmol/kg). These dose levels are comparable to those used in previous studies that evaluated potential pharmacokinetic interactions among THMs (Da Silva *et al.*, 1999, 2000).

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of THMs in mixtures

Groups of five animals received either a single bolus of 0.03125 mmol/kg of one of the four THMs, a mixture containing 0.03125 mmol/kg of the four THMs (total dose = 0.125 mmol/kg) or a mixture containing 0.03125 mmol/kg of the four THMs plus 0.125 mmol/kg of either TCA or DCA. The total dose levels used in this study were comparable to those used in previous THM interaction studies (Da Silva *et al.*, 1999, 2000).

Analysis of THMs in blood

The venous blood concentrations of unchanged THMs were measured from 5 minutes to 6 hours post-administration. Serial blood samples (50 µL) were obtained from a small incision in the tail of each animal. During the sampling period, the rats were briefly restrained in a cone-shaped plastic bag as described by Reigle and Bukva (1984). The blood samples were

placed in glass vials (22 mL), sealed and kept on crushed ice until analyses were performed, within 4 hours.

Blood concentrations of THMs were determined by headspace analysis using a Tekmar[®] headspace autosampler and a Hewlett Packard 5890A gas chromatograph (GC) with a 30 m capillary column (HP-608) and an electron capture detector (ECD). The carrier gas used was argon/methane (95:5) and the flow rate was set at 4.8 mL/min. The initial column temperature was set at 55°C for 5 minutes and then increased at the rate of 7°C/min until it reached 90°C. The vials were incubated at 60°C for 30 minutes and then 1 mL of headspace air was injected into the GC. Retention times for CHCl₃, BDCM, DBCM and TBM were 2.03, 2.85, 4.79 and 7.76 minutes, respectively.

Standard curves were prepared by adding THMs (dissolved in methanol) to blood obtained from control rats according to a method described previously (Da Silva *et al.*, 1999). For the 0.125 mmol/kg dose, the range of standards for blood collection varied between 1 and 50 µmol/L. For the 0.03125 mmol/kg dose, the range varied between 0.12 and 12 µmol/L. All concentrations were in the linear range of the standard curve. The detection limit for the four THMs was 0.022 µmol/L.

Data analysis

The areas under the blood concentration *versus* time curves (AUCs) were calculated according to trapezoidal rule from 5 minutes until the last sampling (4.5 hr for BDCM, DBCM and TBM; 6 hr for CHCl₃). Microsoft Excel[®] was used to integrate AUCs through time. Student's *t*-test was used to compare blood concentrations, maximum concentrations (C_{max}) and AUCs for each THM, following single, binary and mixture administrations. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of individual THMs

Figures 1 to 3 present the blood concentration *versus* time profiles of the four THMs following their co-administration with either TCA, DCA or MCA (0.125 mmol/kg, i.v.) and compare them with those obtained following the administration of the corresponding THM alone. The blood concentrations of CHCl_3 , BDCM and TBM were greater following TCA co-administration in comparison to single THM administrations, at several time points (Figure 1 A, B and D). Higher blood concentrations of DBCM were not observed after co-administration with TCA (Figure 1 C). DCA increased the blood concentrations of CHCl_3 , BDCM and DBCM (Figure 2 A-C). As for MCA, it significantly increased the blood concentrations of CHCl_3 , BDCM and DBCM at selected time points (Figure 3 A-C) but not those of TBM (Figure 3 D).

Table 1 presents the maximal concentration (C_{max}) and area under the blood concentration *versus* time curves (AUC) of THMs administered alone or in combination with chloroacetic acids. The AUCs of CHCl_3 , BDCM and DBCM were increased by a factor of 3.5, 1.6 and 2, respectively, by co-administration of TCA (Table 1). However, AUC of TBM was not significantly modified by co-administration of TCA even though higher blood concentrations of TBM were measured at 1 hr post-administration (Figure 1 D). Other significant changes in AUCs of THMs produced by chloroacetic acids were limited to DBCM (x 2.7) and TBM (x 1.3) by DCA, and BDCM (x 1.8) and DBCM (x 2.5) by MCA (Table 1). C_{max} was increased for all four THMs during co-administration with all three chloroacetic acids but the difference was not statistically significant (except for the effect of MCA on BDCM), partly due to the considerable variability observed between the animals.

Effect of chloroacetic acids on the kinetics of THMs in mixtures

Figures 4 and 5 present the kinetic profile of THMs following their administration alone or as a mixture with or without chloroacetic acids. These results indicate that the blood concentrations of individual THMs are increased when administered in a quaternary mixture, an effect which is further exacerbated by TCA but not DCA.

Table 2 presents the maximum concentrations (C_{max}) and area under the blood concentration versus time curves (AUC) for the four THMs administered singly or with other THMs (each at 0.0325 mmol/kg, i.v.) or again with a chloroacetic acid at 0.125 mmol/kg. The C_{max} of THMs after a single dose of 0.03125 mmol/kg was proportionally lower than that observed following a single dose of 0.125 mmol/kg (Table 1 *vs.* 2). The comparison of AUCs of THMs at 0.03125 and 0.125 mmol/kg indicated that there was a non-linear relationship between dose and AUC under these conditions.

The AUCs of the three brominated THMs (BDCM, DBCM and TBM) were increased by a factor of approximately 3.9 as a result of combined influence of THMs and TCA. The C_{max} and AUC of chloroform were increased, respectively, by a factor of 1.9 and 11.7, following co-administration with TCA. DCA, however, did not produce a significant change in the kinetics or AUCs of THMs in quaternary mixtures (Table 2).

Discussion

Several of the DBPs found in drinking water have been shown to induce cancer in chronic rodent bioassays (Bull *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1998). Moreover, epidemiological studies have suggested an association between DBPs and bladder and colorectal cancer (Cantor, 1997) as well as adverse reproductive effects (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). So far, the major emphasis has been on the evaluation of the toxicity, pharmacokinetics and carcinogenicity of individual DBPs, and more recently on the combined effects of THMs to some extent (Simmons *et al.* 2000; Teuschler *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 1999, 2000). Since the water concentrations of chloroacetic acid levels equal or exceed that of total THMs (Williams *et al.*, 1997), it is relevant to evaluate DBPs as a mixture and particularly the possibility of interactions between the chloroacetic acids and DBPs. The present study is the first *in vivo* investigation focusing on the potential pharmacokinetic interaction between THMs and chloroacetic acids. The results showed that chloroacetic acids modify the kinetics of certain THMs as indicated by the increase in blood concentration and AUC of THMs during combined administrations.

Studies on the combined effects of chloroacetic acids and THMs are very limited. TCA has been reported to increase the toxicity of CHCl_3 in rats, a gender-specific effect, occurring only in females (Davis, 1992). The author speculated that metabolic interactions between TCA and CHCl_3 could have involved, possibly P-450 2E1 (Davis, 1992). Yang and Davis (1997) reported that DCA potentiated the hepatotoxicity of CHCl_3 in both male and female rats, but DCA pretreatment increased hepatic content of cytochrome P-450 only in female rats. Another study revealed that DCA inhibited its own clearance following previous repeated exposures (Gonzalez-Leon *et al.*, 1997). The present study, for the first time, has provided evidence of the possibility that chloroacetic acids may interact with THMs at the pharmacokinetic level. The binary mixture experiments revealed that TCA influenced the kinetics of the four THMs while DCA and MCA only affected two of the four THMs.

The increase in blood concentrations of THMs observed during combined exposures could have been due to a reduction of metabolic clearance produced by chloroacetic acids. Modulation of AUC rather than C_{max} was evident during combined exposures, and this may have resulted from a reduction of THM metabolism either due to binding of chloroacetic acids to proteins or due to competition of metabolism. The ability of TCA to bind to liver proteins has actually formed the basis of its use in stopping metabolic reactions occurring *in vitro* (e.g., Grand *et al.*, 2002). Therefore, metabolic inhibition, possibly of a non-competitive nature, could account for TCA effects on THM pharmacokinetics observed in this study. Further studies on the mechanism of interaction between TCA and THMs could shed light on the relevance of this interaction at low doses to which humans are exposed.

The interactive effect of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of a THM was minimized when the THM was present as a mixture with other THMs. Since the interaction among THMs themselves invokes a certain level of metabolic inhibition, resulting in a rise of their blood concentrations, there is only minimal (TCA) or no (DCA) further increase by chloroacetic acid administrations at the dose levels used in the present study. This aspect was not examined for MCA, which appears to be less potent than TCA or DCA, and which, moreover, occurs at levels lower than TCA and DCA in water supplies in Canada (Williams *et al.*, 1997; Boorman *et al.*, 1999).

The second series of experiments indicated that exposure to the quaternary mixture of THMs in comparison to single administrations increased blood concentrations of CHCl₃, BDCM, DBCM and TBM. The clearance from the blood was reduced for all THMs. The C_{max} and AUC values of THMs in the quaternary mixture were greater than those observed during single administrations. These results are consistent with the possibility that combined exposure to 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs invokes mutual metabolic inhibition. Similar observations of pharmacokinetic interactions between THMs have been reported earlier in male Sprague-Dawley rats receiving THMs by oral bolus (i.e., 1 mmol/kg of the four THMs

in mixture) (Da Silva *et al.*, 1999). These results were interpreted as suggestive of mutual inhibition by THMs, which is probably competitive since THMs are substrates of cytochrome P-450 (Pohl *et al.*, 1977; Anders *et al.*, 1978; Lilly *et al.*, 1997). The present study confirms that presence of pharmacokinetic interactions resulting in enhanced levels of THMs during co-administration, occurs by yet another route of exposure.

The magnitude of increase in blood concentrations of THMs during mixed exposures is the net result of two phenomena: (1) saturation effect, and (2) interactive effect. The saturation effect is reflected by the nature of the relationship between AUC and administered dose of each THM. In the dose range used in the present study (0.03125 – 0.125 mmol/kg), there was a nonlinear relationship between the dose of THMs and AUC (Tables 1 and 2). During combined administrations, due to possible interaction effect, the internal dose of each THM is increased and the magnitude of this increase is determined by the nature of the dose-AUC relationship curve for individual THMs. The increased blood concentrations of THMs during combined administrations could as well be due to the fact that, at four times the dose of individual THMs, there is more total THM occupying metabolizing sites, thus leading to effects similar to that of metabolic saturation.

The implications of the increase in blood concentrations of unchanged THMs during combined exposure scenarios have not been evaluated. The health consequences of change in the pharmacokinetic profiles of THMs would depend upon how the tissue dose surrogate for each THM (e.g., parent chemical AUC, metabolite formed per unit time, metabolite concentration in target tissue) relevant for risk assessment is modified due to interactions. The data presented here suggest that the presence of the other THMs in water may increase the internal exposure to chloroform. But human exposures to THMs occur at much lower levels. For example, based on 2 L/d consumption rate and annual mean concentrations of total THMs (Health Canada, 1993), the ingested dose for humans is calculated to be 14.4 nmol/kg of CHCl_3 , 0.87 nmol/kg of BDCM, 0.69 nmol/kg and

0.01 nmol/kg of TBM. At such low doses and varying proportions, the influence of this interaction on the tissue dose surrogates of relevance to THM risk assessment should be evaluated using physiologically-based models (Haddad *et al.*, 2001). Such approaches have previously been used to establish the threshold for pharmacokinetic interactions among chemicals (e.g., Dobrev *et al.*, 2002).

In conclusion, the present study showed that pharmacokinetic interactions among THMs and between THMs and TCA occurred after a single intravenous dose (0.03125 – 0.125 mmol/kg) in male Sprague-Dawley rats. Even though the dose levels used in this study permitted us to verify the possibility that pharmacokinetic interactions between chloroacetic acids and THMs do occur, they cannot be used directly to infer the magnitude of such an interaction at lower DBP doses to which humans are exposed. Further studies are required to elucidate the quantitative and qualitative aspects of the mechanisms underlying these pharmacokinetic interactions, such that relevance as a function of route, dose and scenario of exposure can be assessed.

Acknowledgements

We thank Ms. Ginette Charest-Tardif and Ms. Mylène Beaudoin for their excellent technical assistance during this study. This work was supported by the Toxic Substances Research Initiative (TSRI) of Health Canada and Environment Canada.

References

Ahmed, A.E., Kubic, V.L., Anders M.W. 1977. Metabolism of haloforms to carbon monoxide. I. *In vitro* studies. *Drug Metab. Dispos.* 5: 198-204.

Anders, M.W., Stevens, J.L., Sprague, R.W., Shaath, Z., Ahmed, A.E. 1978. Metabolism of haloforms to carbon monoxide. II. *In vivo* studies. *Drug Metab. Dispos.* 6: 556-560.

Boorman G.A., Dellarco V., Dunnick J.K., Chapin R.E., Hunter S., Hauchman F., Gardner H., Cox M., Sills R.C. 1999. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Persp.* 107:207-217

Bull, R.J., Birnbaum L.S., Cantor, K.P., Rose, J.B., Butterworth, B.E., Pegram, R.E, Tuomisto, J. 1995. Symposium overview: Water chlorination: Essential process or cancer hazard? *Fundam. Appl. Toxicol.* 28: 155-166.

Cantor, K.P. 1997. Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control* 8: 292-308.

Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Tardif, R. 2000. Evaluation of the pharmacokinetic interactions between orally administered trihalomethanes in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 60: 343-353.

Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Tardif, R. 1999. Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethanes on their respective blood kinetics in the rat. *Toxicol. Lett.* 106: 49-57.

Davis, M.E. 1992. Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid increase chloroform toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health* 37: 139-148.

Davis, M.E., Berndt, W.O. 1992. Sex differences in monochloroacetate pre-treatment effects on chloroform toxicity in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18: 66-71.

Dobrev, I.E., Andersen M.E., Yang, R.S.H. 2001. Assessing interaction thresholds for trichloroethylene in combination with tetrachloroethylene and 1,1,1-trichloroethane using gas uptake studies and PBPK modeling. *Arch. Toxicol.* 75: 134-144.

Gonzalez-Leon, A., Schultz, I.R., Xu, G., Bull, R.J. 1997. Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate in the F344 rat after administration in drinking water. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146: 189-195.

Grand, F., Kilinc, I., Sarkis, A., Guitton, J. 2002. Application of isotopic ratio mass spectrometry for the *in vitro* determination of demethylation activity in human liver microsomes using *N*-methyl-¹³C-labeled substrates. *Anal. Biochem.* 306: 181-187.

Haddad, S., Béliveau, M., Tardif, R., Krishnan, K. 2001. A PBPK modeling-based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures. *Toxicol. Sci.* 63: 123-131.

Health Canada. 1993. Les trihalométhanes. http://www.hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/catalogue/dpc_pubs/rqepdoc_appui/trihalo.pdf

Lilly, P.D., Andersen, M.E., Ross, T.M., Pegram, R.A. 1997. Physiologically based estimation of *in vivo* rates of bromodichloromethane metabolism. *Toxicology* 124: 141-152.

Mills, C.J., Bull, R.J., Cantor, K.P., Reif, J., Hrudey, S.E., Huston, P. 1998. Workshop report. Health risks of drinking water chlorination by-products : report of an expert working group. *Chronic Dis. Can.* 19: 91-102.

Nakajima, T., Elovaara, E., Okino, T., Gelboin, H.V., Klockars, M., Riihimaki, V., Aoyama, T., Vainio, H. 1995. Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133: 215-222.

Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B., Eaton, N.E., Fawell, J., Elliott, P. 2000. Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occup. Environ. Med.* 57: 73-85.

Pohl, L.R., Bhooshan, B., Whittaker, N.F., Krishna, G. 1977. Phosgene: a metabolite of chloroform. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 684-691.

Reigle, R.D., Bukva, N.F. 1984. A method of restraining rats for intravenous injection using a flexible plastic bag. *Lab. Animal Sci.* 34: 497-498.

Rook, J.J. 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat. Exam.* 23: 234-243.

Simmons, J.E., Teuschler, L.K., Gennings, C. 2000. The toxicology of disinfection by-products mixtures: Methods for multichemical assessment, present research efforts, and future directions, in : *Microbial Pathogens and Disinfection By-Products in Drinking Water: Health Effects and Management of Risks* (Craun, G.F., Hauchman, F.S., Robinson, D.E., eds.), pp. 325-340.

Singer P.C., Chang S.D. 1989. Correlations between trihalomethanes and total organic halides formed during water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* 81: 61-65.

Testai, E., De Curtis, V., Gemma, S., Fabrist, L., Gervasi, P., Vittozzi, L. 1996. The role of different cytochrome P450 isoforms in *in vitro* chloroform metabolism. *J. Biochem. Toxicol.* 11: 305-312.

Teuschler, L.K., Gennings, C., Stiteler, W.M., Hertzberg, R.C., Colman, J.T., Thiyagarajah, A., Lipscomb, J.C., Hartley, W.R., Simmons, J.E. 2000. A multi-purpose design approach to the evaluation of risks from mixtures of disinfection by-products. *Drug Chem. Toxicol.* 23: 307-321.

Williams, D.T., Lebel, G.L., Benoit, F.M. 1997. Disinfection by-products in Canadian drinking water. *Chemosphere* 24: 299-316.

Yang, H.-M., Davis, M.E. 1997. Dichloroacetic acid pretreatment of male and female rats increases chloroform metabolism *in vitro*. *Toxicology* 124: 53-62.

Table 1. Maximum concentration (C_{max} - μM) and area under the blood concentration *versus* time curves (AUC - μM.hr) of trihalomethanes administered alone or in combination with chloroacetic acids (n=5, mean ± SE).

Treatments ¹	CHCl ₃ (0-6 hr)		BDCM (0-4.5 hr)		DBCM (0-4.5 hr)		TBM (0-4.5 hr)	
	C _{max} μM	AUC μM.hr	C _{max} μM	AUC μM.hr	C _{max} μM	AUC μM.hr	C _{max} μM	AUC μM.hr
THM alone	30.8±5.4	17.0±0.8	28.2±0.7	36.5±2.7	28.7±5.2	33.8±6.9	34.2±2.2	77.4±5.3
THMs+MCA	28.1±1.9	23.1±2.5	42.0±3.4*	65.3±8.9*	48.0±11.0	83.7±6.8*	35.1±2.2	96.2±6.7
THMs+DCA	34.2±4.9	23.8±3.3	45.7±10.8	46.8±5.6	62.3±14.9	91.3±5.1*	49.6±6.8	103.6±10.8*
THMs+TCA	32.3±5.2	59.4±3.8*	43.8±6.3	59.3±2.1*	36.7±4.0	65.9±8.8*	43.2±2.0	77.1±5.3

¹THMs (CHCl₃, BDCM, DBCM and TBM) and chloroacetic acids (MCA, DCA and TCA) were administered at a dose level of 0.125 mmol/kg.

*Indicates significant difference compared to single administration ($p < 0.05$).

Table 2. Maximum concentration (Cmax - μM) and area under the blood concentration *versus* time curves (AUC - $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) for the four trihalomethanes administered alone or as a mixture with or without a chloroacetic acid (n=5, mean \pm SD).

Treatments ¹	CHCl ₃ (0-6 hr)		BDCM (0-4.5 hr)		DBCM (0-4.5 hr)		TBM (0-4.5 hr)	
	Cmax μM	AUC $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$	Cmax μM	AUC $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$	Cmax μM	AUC $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$	Cmax μM	AUC $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$
THM alone	5.5 \pm 1.2	3.0 \pm 0.4	7.8 \pm 1.1	4.7 \pm 0.4	6.7 \pm 1.8	5.8 \pm 0.4	10.3 \pm 2.6	6.4 \pm 0.8
THMs mixture	9.4 \pm 1.4	7.1 \pm 1.4*	11.5 \pm 1.9	12.2 \pm 0.9*	11.6 \pm 2.3	14.6 \pm 2.5*	11.2 \pm 1.0	16.0 \pm 1.3*
THMs+TCA	10.4 \pm 0.9*	35.0 \pm 2.1*	7.4 \pm 1.2	13.4 \pm 2.5*	8.0 \pm 1.1	16.2 \pm 3.2*	8.5 \pm 1.1	19.2 \pm 3.7*
THMs+DCA	8.1 \pm 2.3	6.7 \pm 0.8*	10.5 \pm 3.2	11.7 \pm 1.1*	11.3 \pm 3.7	14.6 \pm 1.1*	10.9 \pm 3.6	16.4 \pm 0.9*

¹THMs (CHCl₃, BDCM, DBCM and TBM) were administered at a dose level of 0.03125 mmol/kg whereas the dose of chloroacetic acids (TCA and DCA) was 0.125 mmol/kg.

*Indicates significant difference compared to single administration ($p < 0.05$).

Figure legends

Figure 1. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of trichloroacetic acid (n=5; mean \pm SE). * Denotes significant difference ($p < 0.05$) between treatments.

Figure 2. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of dichloroacetic acid (n=5; mean \pm SE). * Denotes significant difference ($p < 0.05$) between treatments.

Figure 3. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of monochloroacetic acid (n=5; mean \pm SE). * Denotes significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Figure 4. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.03125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs plus 0.125 mmol/kg (i.v.) of trichloroacetic acid (n=5; mean \pm SE). * Denotes significant difference ($p < 0.05$) between treatments.

Figure 5. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in rats administered 0.03125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs or as a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs plus 0.125 mmol/kg (i.v.) of dichloroacetic acid ($n=5$; mean \pm SE). * Denotes significant difference ($p < 0.05$) between treatments.

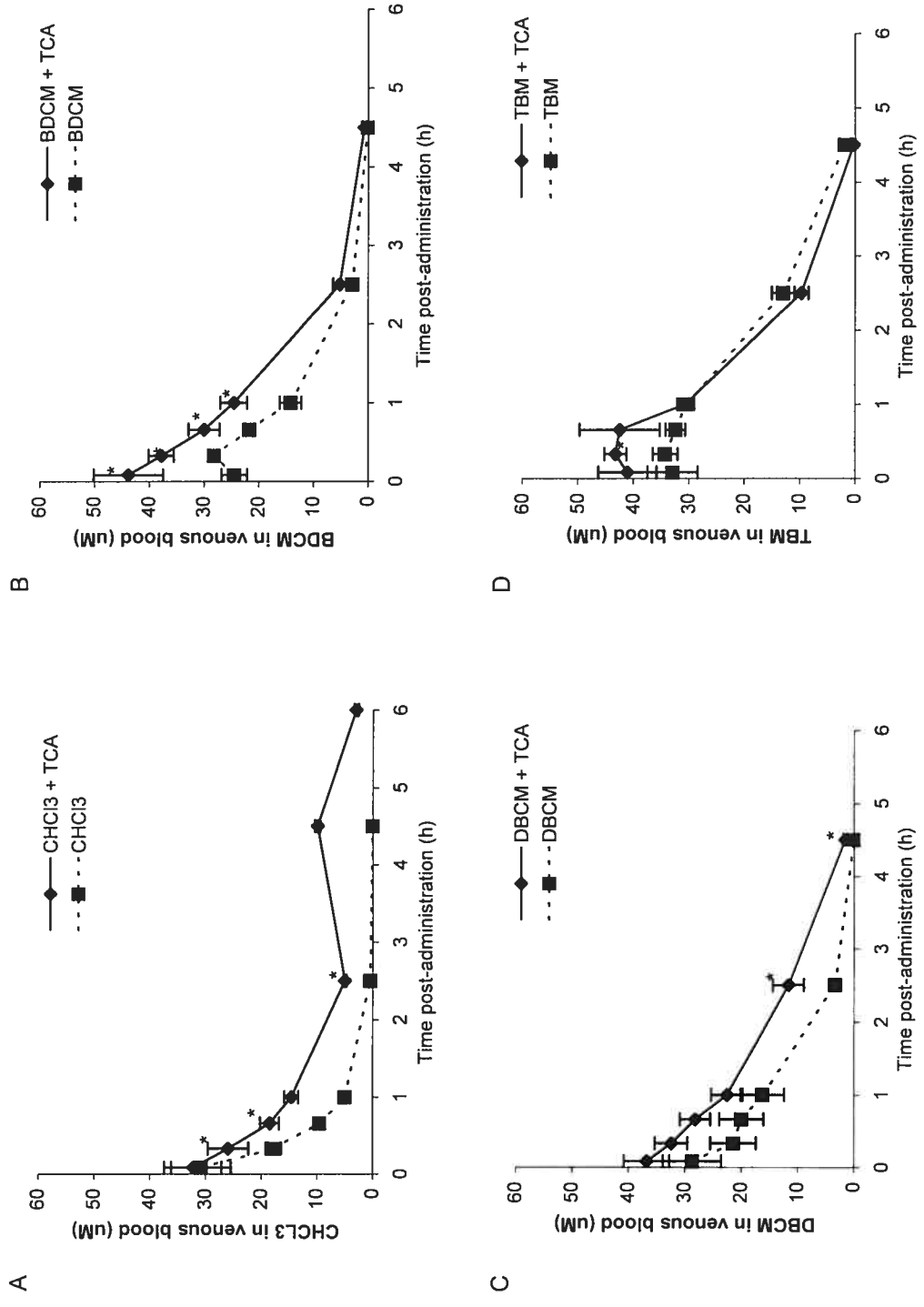


Figure 1

Figure 2

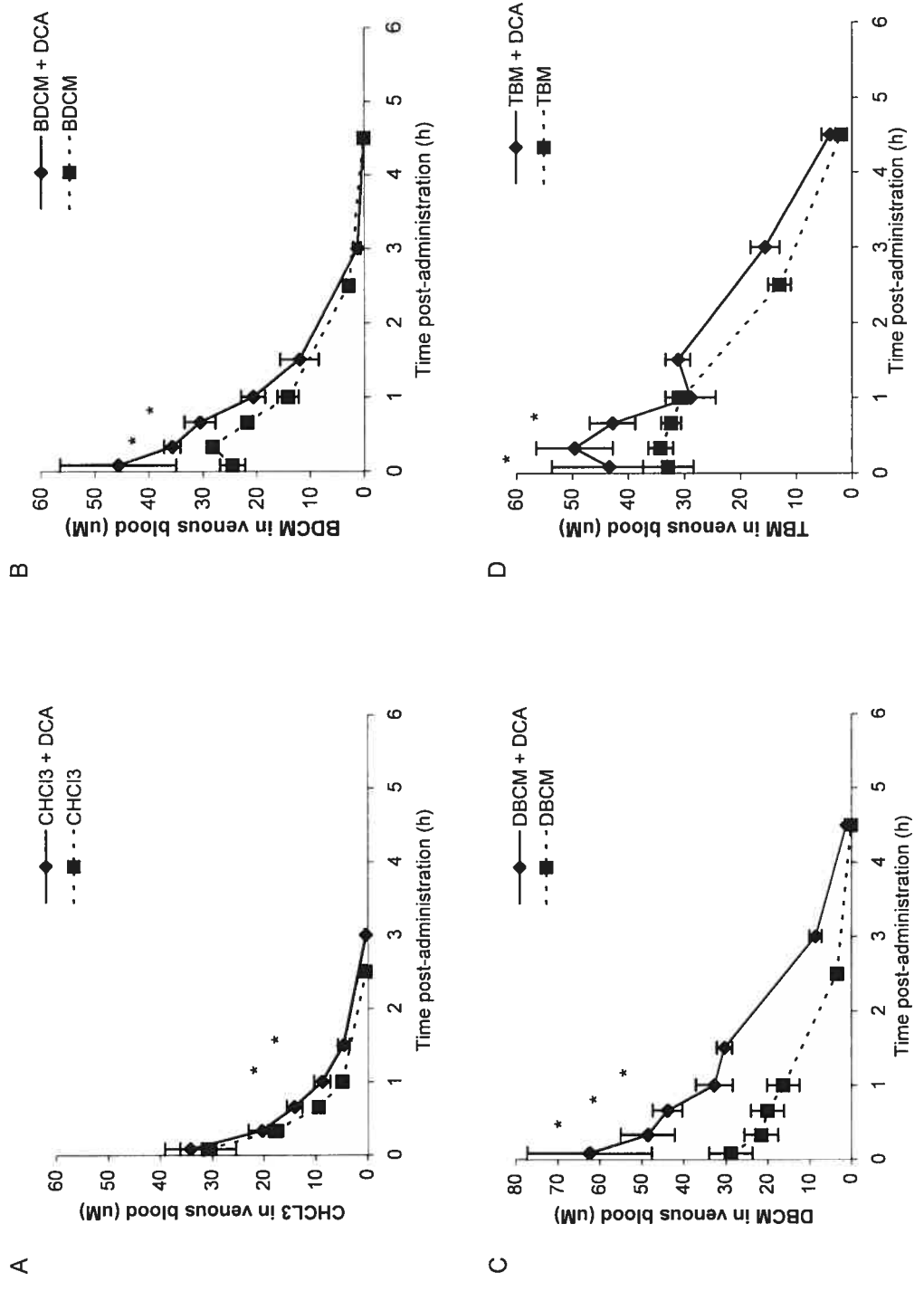


Figure 3

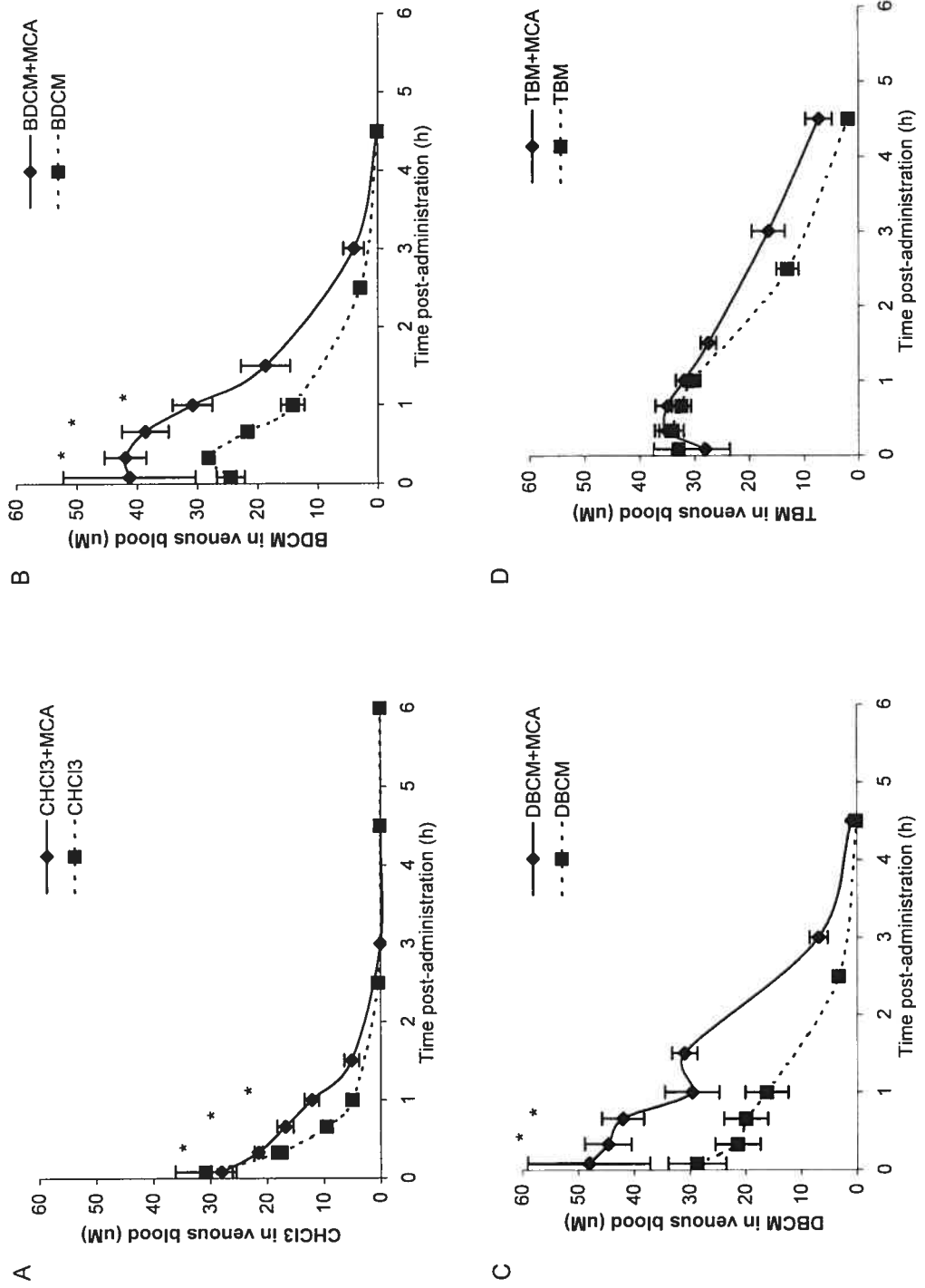


Figure 4

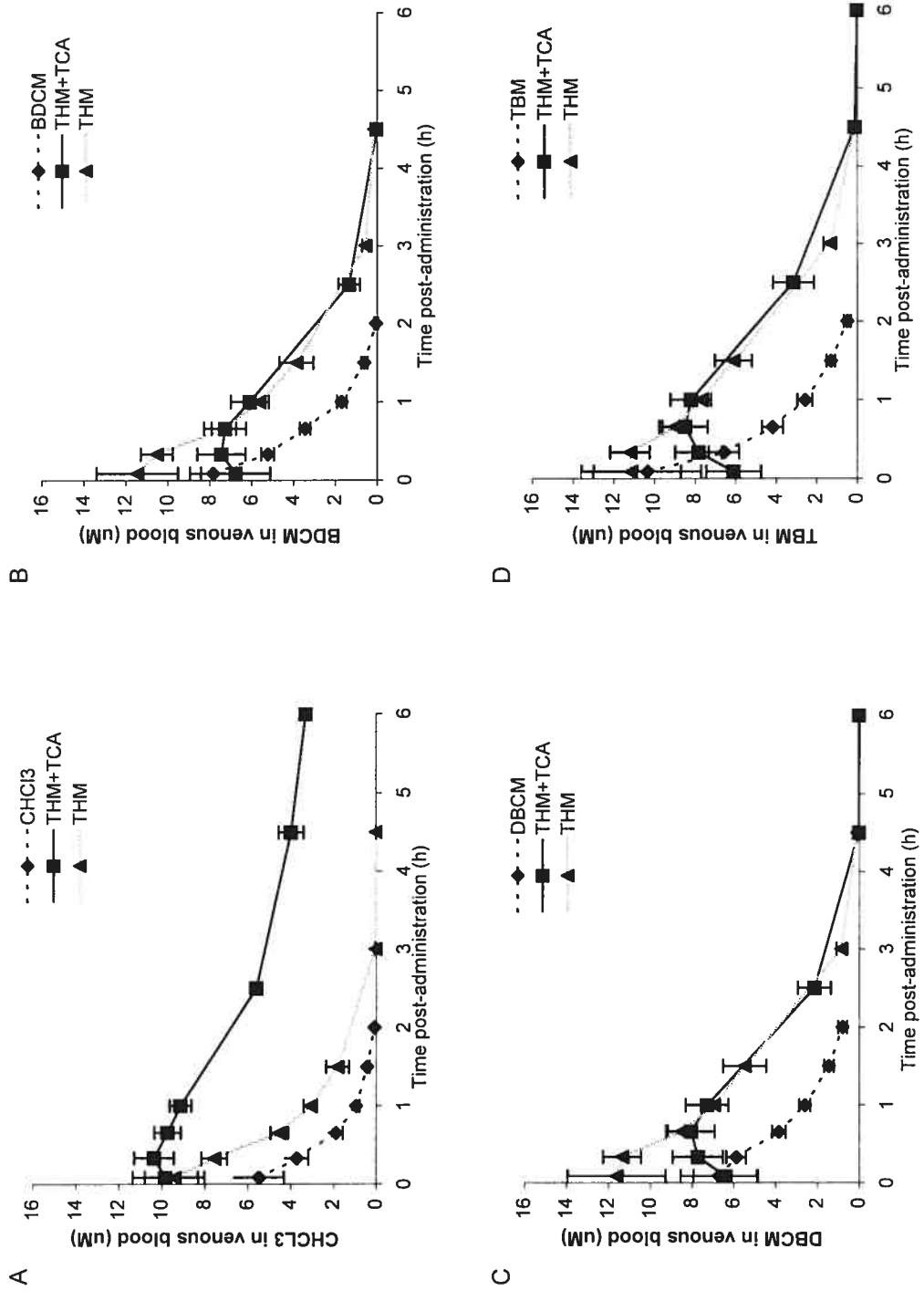
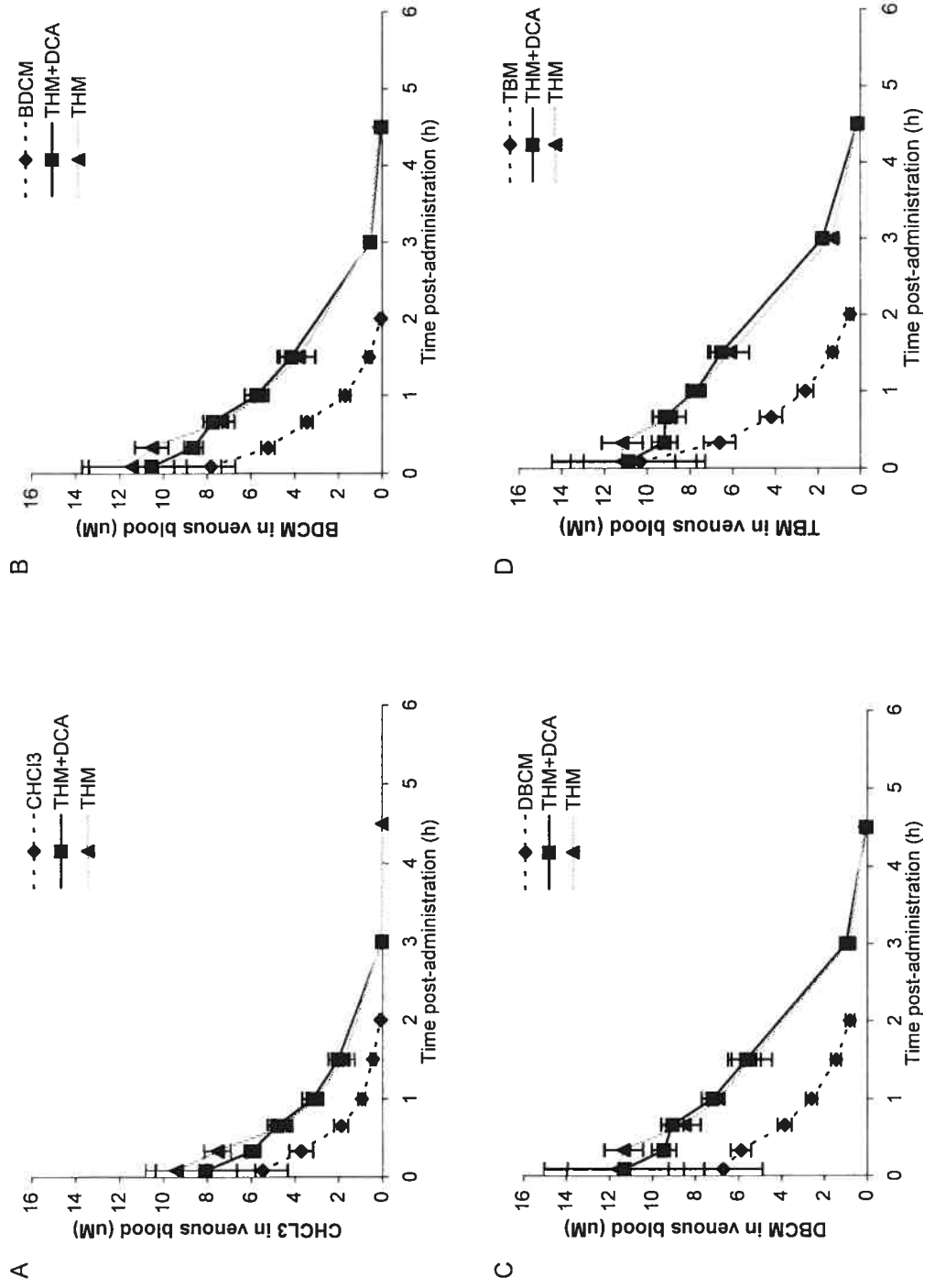


Figure 5



CHAPITRE TROIS

ARTICLE II

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the influence of trihalomethanes (THMs) on the pharmacokinetics of dichloroacetic acid (DCA) and trichloroacetic acid (TCA) in the male Sprague-Dawley rat. Groups of five animals were given, by intravenous injections in the femoral vein, a single dose of (i) 0.125 mmol/kg of TCA, (ii) 0.125 mmol/kg of DCA, or (iii) a binary mixture of 0.125 mmol/kg of a chloroacetic acid (TCA or DCA) plus 0.125 mmol/kg of a THM (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane or bromoform). Additional groups received a mixture containing 0.125 mmol/kg of either TCA or DCA plus 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs. The venous blood concentrations of unchanged TCA and DCA were measured by head-space gas chromatography from 5 minutes to 48 hours post-administration. Results demonstrated that the venous blood concentration profiles of TCA and DCA were not influenced by THMs at the dose levels tested.

Introduction

The evaluation of the pharmacokinetics of disinfection by-products (DBPs) in mixtures is important from the toxicological, biomonitoring and risk assessment perspectives. Several studies have investigated the combined toxicity and pharmacokinetics of DBPs in mixtures (Simmons *et al.* 2000; Teuschler *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 1999, 2000). There is an emerging concern about the chloroacetic acids in DBP mixtures since their concentration equals or exceeds that of trihalomethanes (THM) levels (Williams *et al.*, 1997).

In a recent study, we evaluated the influence of chloroacetic acids on the kinetics of THMs in male Sprague-Dawley rats (St-Pierre *et al.*, 2003). Results showed that simultaneous i.v. administrations of chloroacetic acids (0.125 mmol/kg) affected the pharmacokinetics of THMs by reducing their blood clearance. More specifically, all THMs were affected by the presence of trichloroacetic acid (TCA) whereas dichloroacetic acid (DCA) affected only the kinetics of dibromochloromethane (DBCM) and bromoform (TBM). Monochloroacetic acid (MCA), on the other hand, affected the kinetics of bromodichloromethane (BDCM) and DBCM.

Even though the impact of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of THMs has been evaluated, there are no reports of the investigation of the potential influence of THMs on chloroacetic acid kinetics. Such an investigation is particularly relevant given the fact that urinary chloroacetic acid, more specifically TCA, is used as a biomarker of human exposure to DBPs (Kim *et al.*, 1999). The appropriateness of TCA and DCA as biomarkers of human exposure to DBPs in drinking water is limited by the potential that the kinetics of chloroacetic acids could be modified by THMs during mixture exposures. The present study evaluated the potential influence of THMs on the pharmacokinetics of TCA and DCA in rats.

Materials and Methods

Chemicals

Chloroform (CHCl_3), BDCM, DBCM, TBM, DCA, TCA, sulfuric acid and methyl alcohol (>98% purity) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alkamuls® was obtained from Rhodia (Cranbury, NJ).

Treatment

One week before treatments, adult male Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) were fitted individually with a femoral vein cannula. The details pertaining to the animal husbandry and surgery procedures were described in a previous publication (St-Pierre *et al.*, 2003). All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (University of Montreal, Canada).

Groups of five animals were given, by intravenous injections in the femoral vein, a single dose of 0.125 mmol/kg of either TCA or DCA or a binary mixture of 0.125 mmol/kg of a chloroacetic acid (TCA or DCA) plus 0.125 mmol/kg of a THM (CHCl_3 , BDCM, DBCM or TBM). Additional groups received a mixture containing 0.125 mmol/kg of either TCA or DCA plus 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs. These dose levels are comparable to those used in a previous study that evaluated the influence of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of THMs (St-Pierre *et al.*, 2003).

Analysis of chloroacetic acids in blood

The venous blood concentrations of unchanged TCA and DCA were measured from 5 minutes to 48 hours post-administration. Serial blood samples (50 μl) were obtained from a small incision on the tail of each animal and placed in sealed glass vials (22 mL). Blood concentrations of TCA and DCA were determined by headspace analysis using a Tekmar® headspace autosampler and a Hewlett Packard 5890A gas chromatograph (GC) with a 30 m capillary column (HP-608) and an electron capture

detector (ECD). The carrier gas used was argon/methane (95:5) and the flow rate was set at 4 mL/min. The column temperature was set at 55°C. Before injection, TCA and DCA were methylated by reaction with methanol and sulfuric acid as described by Breimer *et al.* (1974). The reaction took place in the sealed vials while they were incubated at 85°C for 65 minutes. A standard curve was prepared by adding TCA or DCA (dissolved in distilled water) to blood of control rats. Retention times for DCA and TCA were 7.51 and 11.85 minutes, respectively.

Data analysis

The areas under the blood concentration *versus* time curves (AUCs) were calculated according to trapezoidal rule from 5 minutes until the last sampling time (48 hr for TCA, 3 hr for DCA). Student *t*-test was used to compare blood concentrations and AUCs of TCA and DCA, following single, binary and mixture administrations. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Figures 1 to 3 present the blood concentration *vs.* time profiles of TCA and DCA following their administration alone or with THMs. It can be observed that the blood kinetics of TCA and DCA was not influenced significantly by any of the THMs (Figure 1 and 2) or by the mixture of THMs (Figure 3). Mean AUCs (\pm SD) for TCA and DCA, following administration as single compounds, were 2864 ± 1482 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ and 64 ± 23 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, respectively. These AUCs were not modified significantly by co-administration with THMs.

Discussion

Simultaneous exposure to chemicals may result in interactions at the pharmacokinetic or pharmacodynamic level. Pharmacokinetic interactions often lead to a significant change in the blood concentration profile of parent chemicals or urinary metabolite levels. Possibility of simultaneous exposure to chloroacetic acids and THMs arises from the occurrence of these substances as by-products of disinfection. Even though chloroacetic acids have been shown to alter the pharmacokinetics of THMs (St. Pierre *et al.*, 2003), the possibility of the reverse phenomenon has not been verified previously. This study for the first time has evaluated the influence of THMs, present individually or as mixtures, on the pharmacokinetics of DCA and TCA following iv administration. The results showed a clear lack of THM effect on the pharmacokinetics of DCA and TCA at the dose levels tested.

The volume of distribution and clearance (metabolic and renal) together determine the blood concentration profiles of chloroacetic acids following iv administration. There is no mechanistic basis to believe that the THMs could alter the volume of distribution of chloroacetic acids or their renal clearance. Available data suggest that THMs neither bind to plasma proteins nor are excreted significantly by the kidneys, two dominant processes in the pharmacokinetics of chloroacetic acids (Müller *et al.*, 1972; Kim *et al.*, 1999). THMs, however, could interfere with the metabolic clearance of the chloroacetic acids, which are metabolized in the microsomal as well as cytosolic fractions (Larson and Bull, 1992; Ni *et al.*, 1996). The fact that there was no significant change in the pharmacokinetics of DCA and TCA following combined administration with THMs, indicates that either the metabolic clearance is not a sensitive and critical determinant of the venous blood concentration of DCA and TCA, or that the THMs do not accumulate in sufficient quantities to exert a significant effect on the hepatic metabolism of DCA and TCA.

THMs are volatile chemicals contrary to TCA and DCA. Therefore, a fraction of THM is exhaled during passage through the lungs, which is not the case for the chloroacetic acids. Additionally, given that the THMs are lipophilic (Gargas *et al.*, 1989), a significant fraction of these substances accumulate in the fat contributing to lower blood concentrations. Indeed, when the results from the present study are compared with those reported previously for THMs (St-Pierre *et al.*, 2003), it can be seen that the maximal blood concentrations of chloroacetic acids achieved after an iv dose of 0.125 mmol/kg (TCA: ~200 μ M; DCA: ~120 μ M) are much higher compared to THMs (chloroform: ~31 μ M; BDCM: ~28 μ M; DBCM: ~29 μ M; TBM: ~34 μ M), administered at the same dose. This would again suggest that free concentrations at the interaction sites are likely to be lower for THMs than for chloroacetic acids.

Furthermore, chloroacetic acids are hydrophilic and appear to have a high affinity for plasma proteins (Müller *et al.*, 1972). These factors might contribute to more of chloroacetic acids being available for interfering with THMs for hepatic metabolism. The available free concentration of an inhibitor, in conjunction with the inhibition potential, together determine the outcome of an interaction. When one of the two determinants is weak, the interactive outcome is unlikely to be marked. The present study indicates that THMs do not exert a significant interactive effect on the pharmacokinetics of chloroacetic acids, following combined administration. Overall, these negative results provide support to the use of TCA as a biomarker of exposure to DBP mixtures (Kim *et al.*, 1999), since the kinetics of this biomarker is unlikely to be influenced by the combined exposure to THMs in drinking water sources.

Acknowledgements

We thank Ms. Ginette Charest-Tardif and Ms. Mylène Beaudoin for their excellent technical assistance during this study. This work was supported by the Toxic Substances Research Initiative (TSRI) of Health Canada and Environment Canada.

References

- Breimer, D.D., Ketelaars, H.C.J., Van Rossum, J.M. 1974. Gas chromatographic determination of chloral hydrate, trichloroethanol and trichloroacetic acid in blood and in urine. *Journal of Chromatography* 88: 55-63.
- Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Tardif, R. 2000. Evaluation of the pharmacokinetic interactions between orally administered trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 60: 343-353.
- Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., Tardif, R. 1999. Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethanes on their respective blood kinetics in the rat. *Toxicology Letters* 106: 49-57.
- Gargas, M.L., Burgess, R.J., Voisard, D.E., Cason G.H., Andersen, M.E. 1989. Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 98: 87-99.
- Kim, H., Haltmeier, P., Klots, J.B., Weiseil, C.P. 1999. Evaluation of biomarkers of environmental exposures: urinary haloacetic acids associated with ingestion of chlorinated drinking water. *Environmental Research* 80: 187-195.
- Larson, J.L., and Bull, R.J. 1992. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 115: 268-277.
- Müller, G., Spassovki, M., Henschler, D. 1972. Trichloroethylene exposure and trichloroethylene metabolites in urine and blood. *Archives of Toxicology* 29: 335-340.

Ni Y.-C., Wong T.-Y., Lloyd R.V., Heinze T.M., Shelton S., Casciano D., Kadlubar F.F., and Fu P.P. 1996. Mouse liver microsomal metabolism of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol leading to induction of lipid peroxidation via a free radical mechanism. *Drug Metabolism and Disposition* 24: 81-90.

Simmons, J.E., Teuschler, L.K., Gennings, C. 2000. The toxicology of disinfection by-products mixtures: Methods for multichemical assessment, present reasearch efforts, and future directions, in : *Microbial Pathogens and Disinfection By-Products in Drinking Water: Health Effects and Management of Risks* (Craun, G.F., Hauchman, F.S., Robinson, D.E., eds.), pp. 325-340.

St-Pierre, A., Krishnan, K., Tardif, R. 2003. Evaluation of the influence of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A.* 66: 2267-2280.

Teuschler, L.K., Gennings, C., Stiteler, W.M., Hertzberg, R.C., Colman, J.T., Thiyagarajah, A., Lipscomb, J.C., Hartley, W.R., Simmons, J.E. 2000. A multi-purpose design approach to the evaluation of risks from mixtures of disinfection by-products. *Drug and Chemical Toxicology* 23: 307-321.

Williams, D.T., Lebel, G.L., Benoit, F.M. 1997. Disinfection by-products in canadian drinking water. *Chemosphere* 24: 299-316.

Figure legends

Figure 1. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of trichloroacetic acid (TCA) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of this chemical alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of (A) chloroform, (B) bromodichloromethane, (C) dibromochloromethane or (D) bromoform (n=5; mean \pm SE).

Figure 2. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of dichloroacetic acid (DCA) in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of this chemical alone or in combination with 0.125 mmol/kg (i.v.) of (A) chloroform, (B) bromodichloromethane, (C) dibromochloromethane or (D) bromoform (n=5; mean \pm SE).

Figure 3. Comparison of the blood concentration *vs.* time curves of (A) TCA and (B) DCA in rats administered 0.125 mmol/kg (i.v.) of these chemicals alone or in combination with a mixture containing 0.03125 mmol/kg (i.v.) of each of the four THMs (n=5; mean \pm SE).

Figure 1

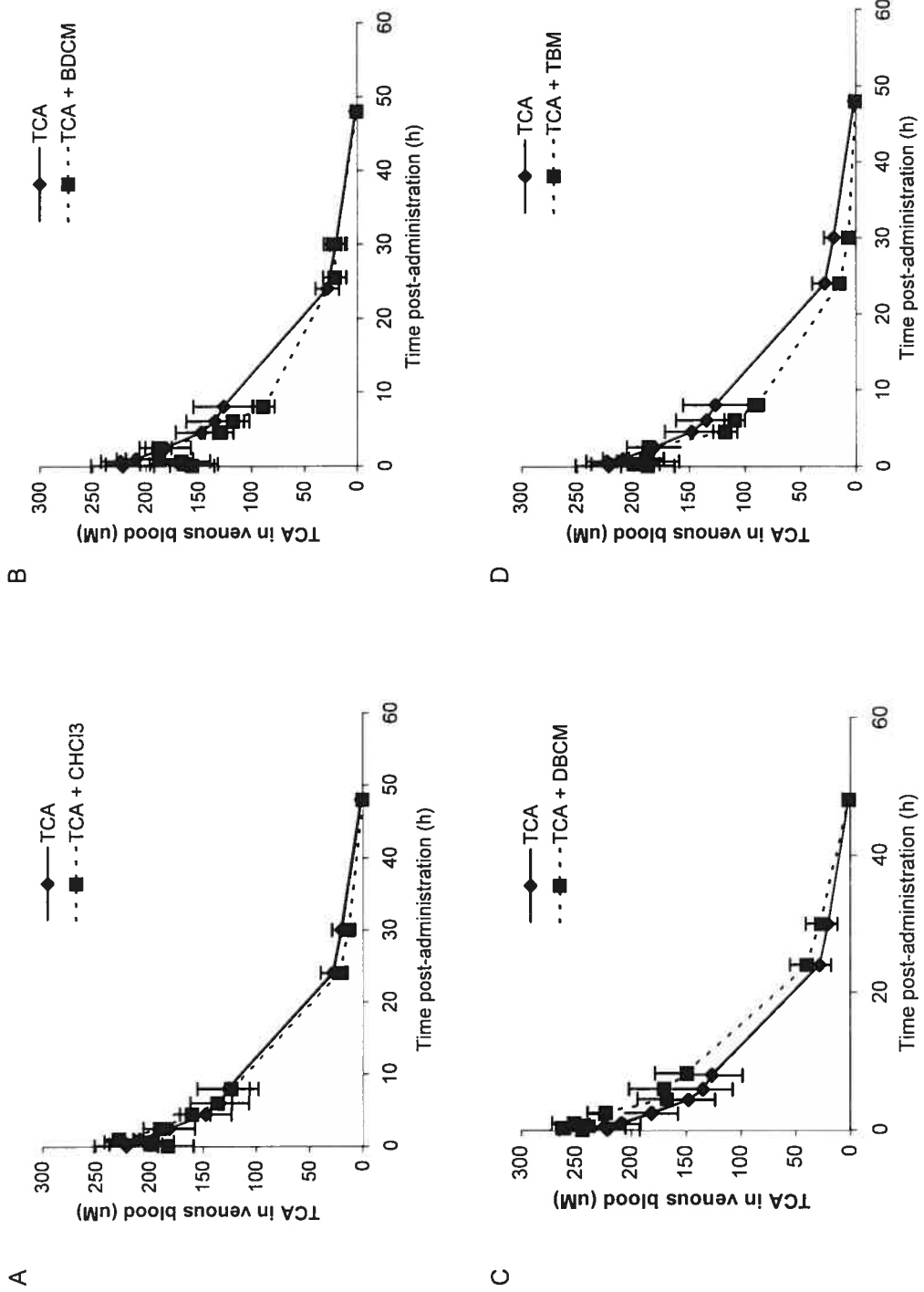
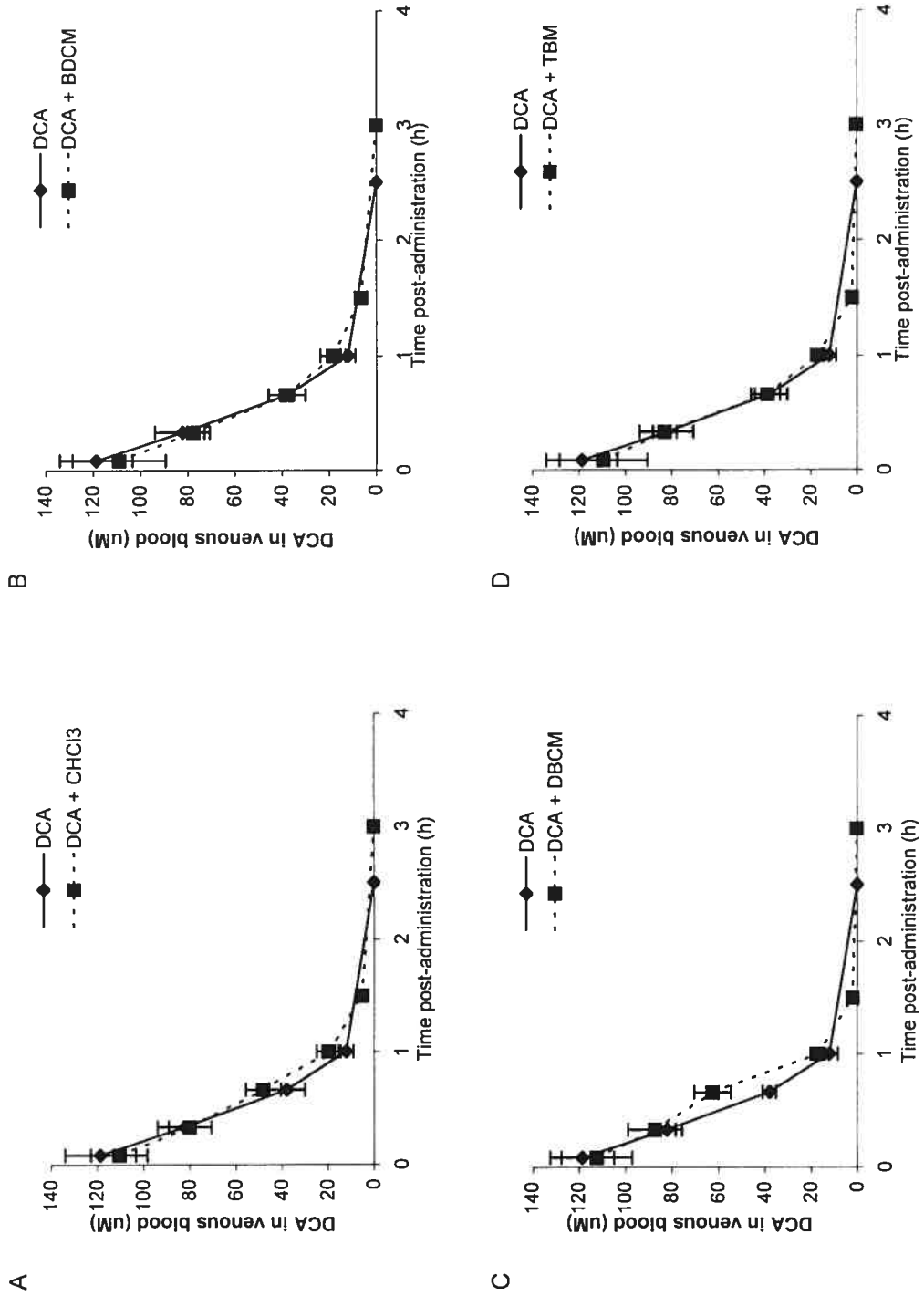
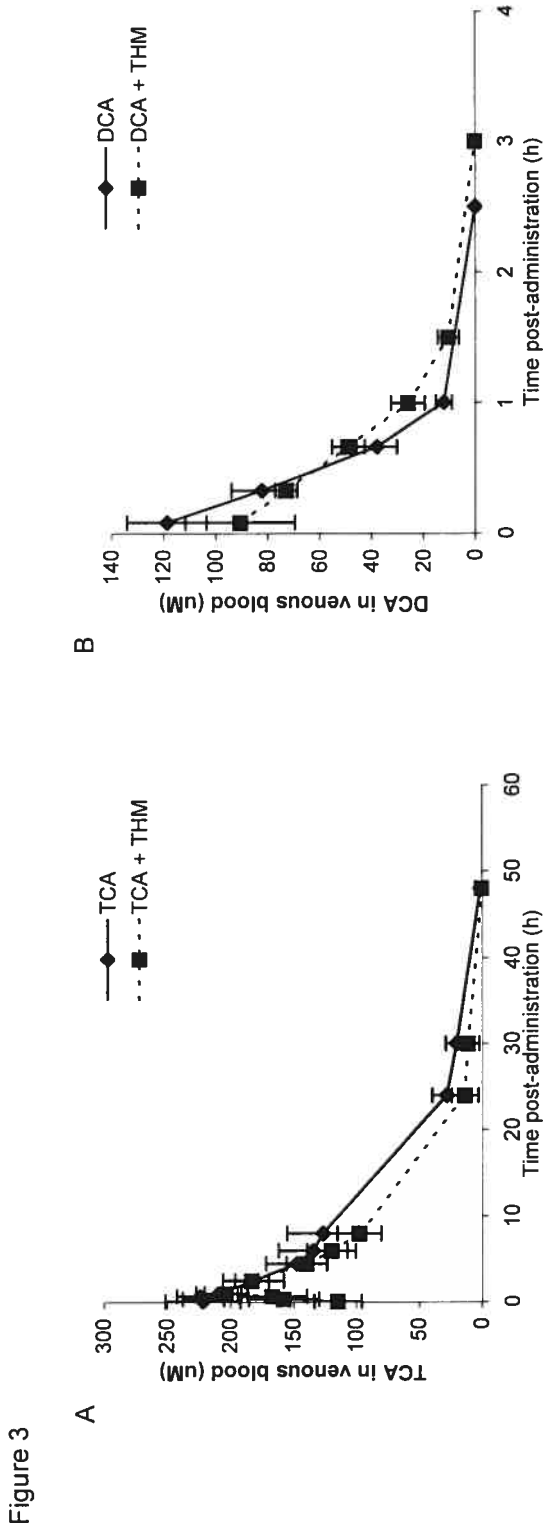


Figure 2





CHAPITRE QUATRE

CARACTÉRISATION *IN VITRO* DES INTERACTIONS MÉTABOLIQUES ENTRE
LES TRIHALOMÉTHANES ET LES ACIDES CHLOROACÉTIQUES.

CHAPITRE QUATRE

ARTICLE III

Abstract

The aim of this study was to investigate the *in vitro* metabolism of trihalomethanes (THMs) in the presence of trichloroacetic acid (TCA), dichloroacetic acid (DCA), monochloroacetic acid (MCA) and 4-methylpyrazole (4-MP) using liver microsomes from male Sprague-Dawley rats. In the vial equilibration technique, initial experiments were carried out using starting concentrations of approximately 40 ppm THMs and 12 – 22 mM chloroacetic acids. The results indicated a mutual metabolic inhibition between THMs present as binary or quaternary mixtures. Whereas DCA and MCA had no influence on THMs, TCA caused an important inhibition of the metabolism of all THMs: chloroform (CHCl_3) (-55%), bromodichloromethane (BDCM) (-34%), dibromochloromethane (DBCM) (-30%) and bromoform (TBM) (-23%). The presence of 4-MP also reduced THM metabolism, the importance of which decreased in the following order: $\text{CHCl}_3 > \text{BDCM} > \text{DBCM} = \text{TBM}$. In further vial equilibration experiments, using 9 – 140 ppm as starting concentrations of THMs, enzyme kinetic parameters (i.e. Michaelis constant, K_m and maximum velocity, V_{max}) were determined, both in the absence and in the presence of TCA (12.2 mM). Results are consistent with a competitive inhibition between TCA and CHCl_3 , whereas the metabolic inhibition of BDCM and TBM by TCA was non-competitive. As for DBCM, results suggest a more complex pattern of inhibition. These results suggest that CYP2E1 is involved in the metabolism of THMs as well as in the metabolic interaction between THMs and TCA.

Introduction

Disinfection by-products (DBPs) are formed by the reaction of chlorine with humic and fulvic acids occurring in natural waters (Rook, 1974; Singer and Chang, 1989). Trihalomethanes (THMs) [chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM), bromoform (TBM)] and, chloroacetic acids [trichloroacetic acid (TCA), dichloroacetic acid (DCA), monochloroacetic acid (MCA)] are the two major families of DBPs.

There is a concern that DBPs, found in drinking water, could pose a risk to human health because the four THMs and two of the chloroacetic acids, namely TCA and DCA, have been shown to induce cancer in chronic rodent bioassays (Bull *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1998). Moreover, several epidemiological studies have suggested an association between DBPs and bladder and colorectal cancer (Cantor, 1997) as well as adverse reproductive effects (Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). In addition, Canadian monitoring efforts have indicated that chloroacetic acid levels in water equal and often exceed total THM levels (Williams *et al.*, 1997).

So far, most of the studies have been directed toward the characterization of the toxicity of individual DBPs. Since several DBPs are simultaneously present in drinking water, it is important to consider DBPs as a mixture and verify the possibility of interactions between the substances. Davis (1992) demonstrated that repeated administrations of TCA and DCA can increase the toxicity of CHCl_3 . More recently, St-Pierre *et al.* (2003) showed that simultaneous i.v. administrations of TCA, DCA, MCA (0.125 mmol/kg) or a quaternary mixture of THMs (total dose: 0.125 mmol/kg) affected the toxicokinetics of one or more THMs by reducing their clearance from blood. Of particular importance is that, all THMs were affected by the presence of TCA. Whereas DCA affected the kinetics of DBCM and TBM, MCA affected the kinetics of BDCM and DBCM only (St-Pierre *et al.*, 2003). Conversely, neither TCA nor DCA kinetics was modified by the co-administration of one or more THMs (St-Pierre *et al.*, 2004).

Similarly, administration of a quaternary mixture of THMs resulted in increased blood concentrations of all THMs, indicating that the four THMs might interact at the metabolic level resulting in a decrease in their metabolism rate (Da Silva *et al.*, 1999, 2000). All four THMs are metabolized into carbon monoxide by isozymes of cytochrome P450 (Ahmed *et al.*, 1977). THMs are also metabolized into carbon dioxide which is rapidly exhaled (Ahmed *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1974; Mathews *et al.*, 1990). For chloroform, the oxidative pathway generates phosgene, a reactive and toxic metabolite (Pohl *et al.*, 1977). Phosgene can bind covalently to nucleophilic components of tissue proteins and is considered responsible for the toxicity of chloroform (Pohl *et al.*, 1980). The reductive pathway of chloroform generates the dichloromethylcarbene free radical (Tomasi *et al.*, 1985; Testai and Vitozzi, 1986). BDCM is metabolized to reactive intermediates more rapidly than chloroform (Lilly *et al.*, 1997). Stevens and Anders (1979) reported that dibromocarbonyl is an intermediate of bromoform.

It has been demonstrated that, for chloroform and BDCM, CYP2E1 acts at low concentrations while CYP2B1/2 acts at high concentrations (Thornton-Manning *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1995). Furthermore, it has been reported that CYP1A2 is also implicated in the metabolism of BDCM (Allis *et al.*, 2002).

CYP2E1 is considered responsible for the metabolism of TCA (Ni *et al.*, 1996). DCA is extensively metabolized by the liver to glyoxylate, which is further metabolized to glycine, oxalate and CO₂ (Stacpoole, 1989). Many authors have demonstrated that the metabolism of DCA occurs mainly in the cytosol, while the metabolism of glyoxylate into glycine and CO₂ occurs in the mitochondria (James *et al.*, 1998; Lipscomb *et al.*, 1995). Others have reported that cytochrome P450 is also involved in the metabolism of DCA (Ni *et al.*, 1996; Larson and Bull, 1992). Both DCA and TCA can be reductively dechlorinated or metabolized into CO₂ (James *et al.*, 1998; Larson and Bull, 1992). As for MCA, Yllner (1971) estimated that 66-85% was metabolized to

S-carboxymethyl-L-cysteine and thiodiacetic acid through glutathione conjugation pathway.

Even though pharmacokinetic interactions among THMs and chloroacetic acids have been demonstrated *in vivo* (St-Pierre *et al.*, 2003), the actual mechanism is not known. The *in vivo* studies speculated metabolic interference among DBPs as the potential interaction mechanism. The present study was designed to investigate the relevance of metabolic interference as the potential mechanism of interaction among THMs, as well as between THMs and chloroacetic acids. More precisely, the metabolism of trihalomethanes was investigated *in vitro* when they were present singly or, in the presence of chloroacetic acids and 4-methylpyrazole, using liver microsomes from male Sprague-Dawley rats. Further, the enzyme kinetic parameters (i.e. Michaëlis constant, K_m and maximum velocity, V_{max}) were determined for the four THMs in the absence and presence of TCA in order to gain some insights on the mechanism of the inhibition exerted by TCA.

Materials and Methods

Chemicals

Chloroform (99.9%), BDCM (98%), DBCM (98%), TBM (98%), MCA (99%), DCA (99%) and TCA (99.9%) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Trizma-base, Trizma-HCl, potassium chloride (99%), sucrose, EDTA, magnesium chloride (MgCl_2) (99%), glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-6-phosphate dehydrogenase, β -NADP, 4-methylpyrazole hydrochloride (4-MP) and a kit for protein determination were all obtained from Sigma Chemicals Co. (Oakville, Ontario, Canada). Potassium phosphate (monobasic and dibasic) was purchased from Biopharm (Laval, Quebec, Canada).

Microsomes

Male Sprague-Dawley rats, weighing 240-260 g, were sacrificed and the liver from individual animals removed, weighed and cut in pieces. Tris-KCl buffer (1:4, v/v) was added and the mixture was then homogenized. Microsomes were prepared by differential centrifugations (10 000 *g*, and 105 000 *g* twice at 4°C) and were suspended in 0.25 M sucrose, 0.05 M Tris, 5.4 mM EDTA, pH 7.4 (Csanady *et al.*, 1992). They were then stored at -80°C. The concentration of proteins was measured using a method developed by Lowry *et al.* (1951).

Metabolism analysis

Reactions were carried out with the vial equilibration technique (Gargas *et al.*, 1989). NADP^+ and phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) containing EDTA, G-6-P, G-6-P dehydrogenase and MgCl_2 were introduced into glass vials (22 mL). The vials were incubated for 10 minutes in order to equilibrate pressure and temperature. THMs and chloroacetic acids, singly or as a mixture, were then added to the vials, along with 1 mg microsomal protein. More precisely, 1 mL of air containing one or several THMs (vapours) was

added to the vials to give an initial concentration of ~ 40 ppm. 50 μ L of a TCA, DCA or MCA solution (in phosphate buffer) was added into the reaction mixture to reach a final concentration of 12.2 mmol/L for TCA, 15.5 mmol/L for DCA and 21.2 mmol/L for MCA. Incubation times were 0, 10, 20 and 40 minutes at 37°C. A volume of 16 μ L of HCl (4 mol/L) was added to stop the reactions. At each time point, 1 mL of headspace air drawn from the test vials was injected into a chromatograph. Vials containing boiled (i.e. denatured) microsomes were used as controls. Additional experiments were conducted with 4-MP (0.14 mmol/L), a known metabolic inhibitor of cytochrome P450 CYP2E1 isoform (Halper *et al.*, 1994).

Concentrations of THMs were determined by headspace analysis using a Varian CP-3800 gas chromatograph (GC) with a 30 m column (DB-608) and an electron capture detector. The flow of the carrier gas was set at 4.7 mL/min and the initial column temperature was set at 80°C for 6 minutes. Retention times for CHCl_3 , BDCM, DBCM, and TBM were 1.92, 2.33, 3.25, and 5.30 minutes, respectively. All samples were analyzed in duplicate.

Kinetic analysis

Different initial concentrations of THMs (9, 19, 39, 72 and 140 ppm) were used for the determination of the kinetic parameters with the vial equilibration technique described above. For TBM, two additional concentrations of 57 and 96 ppm were used. Incubation time and temperature were 40 minutes and 37°C, respectively. Maximal velocity (V_{max}) and apparent Michaelis constant (K_m) were determined by Lineweaver-Burk plot (Segel, 1993). Plots relating the reciprocal of velocity (V) for each THM to the reciprocal of THM concentrations $[S]$ showed linear correlations ($r > 0.98$ except for TBM, $r = 0.91$). The nature of inhibition between THMs and TCA was also derived from Lineweaver-Burk plot analysis. The impact of TCA was investigated using similar concentrations of each THM (9, 19, 39, 72 and 140 ppm) in the presence of a fixed concentration (12.2 mmol/L) of TCA. For TBM, the results obtained with the 9 ppm experiment were

omitted because, after 10 minutes of incubation, concentrations of TBM were below the limit of quantification (< 2.3 ppm).

Results

Figure 1 presents the time course of the concentration profiles of CHCl_3 , BDCM, DBCM and TBM in the headspace of the vials, in the presence of TCA, and compares them with those obtained following incubation of THMs alone. These results show that TCA clearly inhibits the biotransformation of all THMs, CHCl_3 (-55%), BDCM (-34%), DBCM (-30%) and TBM (-23%).

Figure 2 depicts the reduced rate of the *in vitro* metabolism of each of the THMs present as a quaternary mixture. In this experiment, the percent inhibition evaluated at the end of the incubation period was 99, 95, 76 and 51 for CHCl_3 , BDCM, DBCM and TBM, respectively. Table 1 summarizes the data on the percent inhibition of the metabolism of each THM in the presence of other THMs and chloroacetic acids.

Figure 3 indicates that the presence of 4-methylpyrazole caused a significant inhibition of the metabolism of all four THMs: CHCl_3 (-100%), BDCM (-92%), DBCM (-77%) and TBM (-77%). At the concentrations used in the present study, neither MCA nor DCA modified the *in vitro* metabolism of the individual THMs.

Figure 4, which presents the Lineweaver-Burk plots of the four THMs alone and in the presence of TCA, show that, overall, TCA acts as a competitive inhibitor for CHCl_3 metabolism and as non-competitive inhibitor for BDCM and TBM. The interaction between DBCM and TCA was less clear (Figure 4C). Because DBCM is structurally similar to BDCM and TBM than is chloroform, the inhibition by TCA is probably non-competitive as well.

The kinetic parameter values (i.e. Michaelis constant, K_m and maximum velocity, V_{\max}) for the four THMs in the absence and presence of TCA are presented in Table 2. The presence of TCA increased the affinity constant (K_m) value for chloroform (+310%) but did not modify its V_{\max} significantly. However, TCA decreased the V_{\max} of the three brominated THMs. The

intrinsic clearance ($Cl_{int}: V_{max}/K_m$) calculated using the *in vitro* data indicate that the *in vitro* intrinsic clearance of the four THM was decreased in the presence of TCA: $CHCl_3$ (-66%), BDCM (-34%), DBCM (-13%), TBM (-22%).

Discussion

Pharmacokinetic interactions among THMs as well as between chloroacetic acids and THMs have been reported (Da Silva *et al.*, 1999, 2000; St-Pierre *et al.*, 2003). The potential mechanism underlying these interactions has not been investigated previously. The present study demonstrated a mutual metabolic interaction among THMs present as binary or quaternary mixtures. This is consistent with the results of previous *in vivo* studies speculative of a mutual kinetic interaction between THMs (Da Silva *et al.*, 1999, 2000). In every mixture investigated, chloroform and bromoform were the most and less inhibited THM, respectively.

Neither MCA nor DCA modified the *in vitro* metabolism of THMs with liver microsomes from rats, which is consistent with the findings of Lipscomb *et al.* (1995) who reported that the metabolism of DCA occurs primarily in the cytosol. As for MCA, Davis and Berndt (1992) also noticed that it had little effect on CHCl_3 metabolism, an observation that is consistent with the fact that the conjugation with glutathione is the major route of biotransformation of MCA (Yllner, 1971). The lack of significant influence of DCA and MCA on THM metabolism is also consistent with previous *in vivo* observations (St-Pierre *et al.*, 2003).

TCA, however, caused an important inhibition of the metabolism of all THMs: CHCl_3 (-55%), BDCM (-34%), DBCM (-30%) and TBM (-23%). TCA showed similar effects to what was observed during *in vivo* studies: the biotransformation of all THMs was inhibited, chloroform being the most influenced while bromoform was the less influenced (St-Pierre *et al.*, 2003). Interestingly, the inhibition exerted by the quaternary THM mixture was consistent with what was observed for TCA, in the sense that chloroform was the most inhibited (-99%) whereas TBM was the one less affected (-49%). 4-methylpyrazole (4-MP), a known competitive inhibitor of CYP2E1-mediated metabolism (McMartin and Collins, 1988), also reduced THM metabolism similarly to what was observed for TCA. This is consistent with

the results of the kinetic analysis which indicated that the TCA is a competitive inhibitor of chloroform metabolism.

For BDCM and TBM, results showed that TCA acted via a non-competitive mechanism. The interaction mechanism between DBCM and TCA was unclear and could involve mixed inhibition mechanisms. In all cases, TCA metabolism via CYP2E1 may be in competition with the metabolism of those THMs that are also substrates of CYP2E1 – which is clearly the case with chloroform but less clear with other THMs. In addition, TCA, by binding to liver proteins, may non competitively inhibit THM metabolism. The net outcome is that, in some cases (e.g., chloroform), competitive inhibition is the dominant process whereas in others (e.g., BDCM, TBM), the non-competitive inhibition is the apparent mechanism.

It is likely that, under the present *in vitro* conditions, more than one isoform of P450 played a role in the metabolism of THMs. Nakajima *et al.* (1990) observed that CYP2E1 and CYP2B1/2 metabolize similar compounds but with a different affinity. CYP2E1 has been known to be involved in the metabolism of halogenated compounds as well as chlorinated volatile organic compounds of low molecular weight (Lieber, 1997; Nakajima, 1997). The important inhibition caused by the presence of 4-MP suggests the involvement of the isoform CYP2E1 in the interaction between CHCl_3 and TCA. Davis (1992) also reported that CYP2E1 was responsible for the metabolic interaction between haloacetic acids and CHCl_3 . Because CYP2E1, a high affinity isoform, is active at low concentrations and CYP2B1/2 at high concentrations, it is likely that the concentrations of THMs used in this study may have influenced the isoform involved in the metabolism as was previously shown for chloroform and BDCM (Thornton-Manning *et al.*, 1993; Testai *et al.*, 1996). However, V_{\max} values obtained in this study are comparable to previous estimates. When expressed from mg of liver protein to kg of rat, the following values of V_{\max} were obtained: 3.57, 4.5, 7.09 and 8.46 mg/hr/kg for chloroform, BDCM, DBCM and TBM, respectively. Corley *et al.* (1990), using a gas uptake technique, reported a

value of 6.8 mg/hr/kg for chloroform. A similar approach gave a V_{\max} of 12.8 mg/hr/kg for BDCM (Lilly *et al.*, 1997). Da Silva *et al.* (1999) reported V_{\max} values of 9.31, 8.01, 13.7 and 10.4 mg/hr/kg for chloroform, BDCM, DBCM and TBM, respectively, following optimization with a PBPK modelling approach. Therefore, the values determined in the present study are consistent with previous reported values.

Overall, the results of this *in vitro* study are consistent with: (i) competitive metabolic inhibition among THMs, (ii) competitive inhibition between chloroform and TCA, and (iii) non-competitive inhibition of the metabolism of other THMs by TCA. The results are also suggestive of the involvement of CYP2E1 in the interaction between CHCl_3 and TCA. Based on these results, the observed pharmacokinetic interactions in animals exposed to DBP mixtures (Da Silva *et al.*, 1999, 2000; St-Pierre *et al.*, 2003) would appear to be a result of inhibition of THM metabolism during mixed exposures. The elucidation of the mechanism of interaction among DBPs is one step in the direction of predicting the extent of change in blood and tissue kinetics in humans exposed to low levels of these chemicals in mixtures.

Acknowledgements

We thank Ms. Mylène Beaudoin for her excellent technical assistance during this study. This work was supported by the Toxic Substances Research Initiative (TSRI) of Health Canada and Environment Canada.

References

- Ahmed, A.E., Kubic, V.L., and Anders, M.W., 1977, Metabolism of haloforms to carbon monoxide. II. *In vitro* studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 5, 198-204.
- Ahmed, A.E., Kubic, V.L., Stevens, J.L., and Anders, M.W., 1980, Halogenated methanes: metabolism and toxicity. *Federation Proceedings*, 39, 3150-3155.
- Allis, J.W., Anderson, B.P., Zhao, G., Ross, T.M., Pegram, R.A., 2002, Evidence for the involvement of CYP1A2 in the metabolism of bromodichloromethane in rat liver. *Toxicology*, 176, 25-37.
- Brown, D.M., Langley, P.F., Smith D., and Taylor, D.C., 1974, Metabolism of chloroform. I. The metabolism of [¹⁴C] chloroform by different species. *Xenobiotica*, 4, 141-163.
- Bull, R.J., Birnbaum L.S., Cantor, K.P., Rose, J.B., Butterworth, B.E., Pegram, R.E, and Tuomisto, J., 1995, Symposium overview: Water chlorination: essential process or cancer hazard? *Fundamental and Applied Toxicology*, 28, 155-166.
- Cantor, K.P., 1997, Drinking water and cancer. *Cancer Causes and Control*, 8, 292-308.
- Corley R.A., Mendrala A.L., Smith F.A., Staats D.A., Gargas M.L., Conolly R.B., Andersen M.E., and Reitz R.H., 1990, Development of a physiologically based pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103, 512-527.

Csanady G.A., Guengerich F.P., Bond J.A., 1992, Comparison of the biotransformation of 1,3-butadiene and its metabolite, butadiene monoepoxyde, by hepatic and pulmonary tissues from human, rats and mice. *Carcinogenesis*, 13, 1143-1153.

Davis, M.E., 1992, Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid increase chloroform toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 37, 139-148.

Davis, M.E., and Berndt, W.O., 1992, Sex differences in monochloroacetate pre-treatment effects on chloroform toxicity in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18, 66-71.

Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., and Tardif R., 1999, Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethane on their blood kinetics in the rat. *Toxicology Letters*, 106, 49-57.

Da Silva, M.L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., and Tardif R., 2000, Evaluation of the pharmacokinetic interactions between orally administered trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 60, 343-353.

Gargas M.L., Burgess R.J., Voisard D.E., Cason G.H., and Andersen M.E., 1989, Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 98, 87-99.

Halper J.R., Guengerich F.P., Bend J.R., and Correira M.A., 1994, Contemporary issues in toxicology. Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 125, 163-175.

James, M.O., Yan, Z., Cornett, R., Jayanti, V.M.K.M., Henderson, G.N., Davydova, N., Katovich, M.J., Pollock, B., and Stacpoole P.W., 1998, Pharmacokinetics and metabolism of (¹⁴C)dichloroacetate in male Sprague-Dawley rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 1134-1143.

Larson, J.L., and Bull, R.J., 1992, Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115, 268-277.

Lieber, C.S., 1997, Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiological Reviews*, 77, 517-544.

Lilly, P.D., Andersen, M.E., Ross, T.M., and Pegram, R.A., 1997, Physiologically based estimation of in vivo rates of bromodichloromethane metabolism. *Toxicology*, 124, 141-152.

Lipscomb, J.C., Mahle, D.A., Brashear, W.T., and Barton, H.A., 1995, Dichloroacetic acid: metabolism in cytosol. *Drug Metabolism and Disposition*, 23, 1202-1205.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randell R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265.

Mathews, J.M., Troxler, P.S., and Jeffcoat, A.R., 1990, Metabolism and distribution of bromodichloromethane in rats after single and multiple oral doses. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 30, 15-22.

McMartin, K.E., and Collins, T.D., 1988, Distribution of oral 4-methylpyrazole in the rat: inhibition of elimination by ethanol. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology*, 26, 451-466.

Mills, C.J., Bull, R.J., Cantor, K.P., Reif, J., Hrudey, S.E., and Huston, P., 1998, Workshop report. Health risks of drinking water chlorination by-products : report of an expert working group. *Chronic Diseases in Canada*, 19, 91-102.

Nakajima, T., Wang, R.S., Murayama, N., Sato, A., 1990, Three forms of trichloroethylene-metabolizing enzymes in rat liver induced by ethanol, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102, 546-552.

Nakajima, T., Elovaara, E., Okino, T., Gelboin, H.V., Klockars, M., Riihimaki, V., Aoyama, T., and Vainio, H., 1995, Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 133, 215-222.

Nakajima, T., 1997, Cytochrome P450 isoforms and the metabolism of volatile hydrocarbons of low relative molecular mass. *Journal of Occupational Health*, 39, 81-91.

Ni, Y.-C., Wong, T.-Y., Lloyd, R.V., Heinze, T.M., Shelton, S., Casciano, D., Kadlubar, F.F., and Fu, P.P., 1996, Mouse liver microsomal metabolism of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol leading to induction of lipid peroxidation via a free radical mechanism. *Drug Metabolism and Disposition*, 24, 81-90.

Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B., Eaton, N.E., Fawell, J., and Elliott, P., 2000, Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occupational and Environmental Medicine*, 57, 73-85.

Pohl, L.R., Bhooshan, B., Whittaker, N.F., and Krishna, G., 1977, Phosgene: a metabolite of chloroform. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 79, 684-691.

Pohl, L.R., Martin, J.L., and George, J.W., 1980, Mechanism of metabolic activation of chloroform by rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 29, 3271-3276.

Rook, J.J., 1974, Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment and Examination*, 23, 234-243.

Segel, I.H., 1993, *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems* (New York: John Wiley & Sons, Inc.).

Singer, P.C., and Chang, S.D., 1989, Correlations between trihalomethanes and total organic halides formed during water treatment. *Journal of American Water Works Association*, 81, 61-65.

Stacpoole, P.W., 1989, The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism*, 38, 1124-1144.

Stevens, J.L., and Anders, M.W., 1979, Metabolism of haloforms to carbon monoxide – III. *Biochemical Pharmacology*, 28, 3189-3194.

St-Pierre, A., Krishnan, K., and Tardif, R., 2004, Evaluation of the influence of trihalomethanes on the pharmacokinetics of chloroacetic acids in the rat. *Submitted to Xenobiotica*.

St-Pierre, A., Krishnan, K., and Tardif, R., 2003, Evaluation of the influence of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 66: 2267-2280.

Thornton-Manning, J.R., Gao, P., Lilly, P.D. and Pegram, R.A., 1993, Acute bromodichloromethane toxicity in rats pretreated with cytochrome P450 inducers and inhibitors. *The Toxicologist*, 13, 360.

Testai, E. and Vitozzi, L., 1986, Biochemical alterations elicited in rat liver microsomes by oxidation and reduction products of chloroform metabolism. *Chemico-biological Interactions*, 59, 157-171.

Testai, E., De Curtis, V., Gemma, S., Fabrizi, L., Gervasi, P., and Vitozzi, L., 1996, The role of different cytochrome P450 isoforms in *in vitro* chloroform metabolism. *Journal of Biochemical Toxicology*, 11, 305-312.

Tomasi, A., Albano, E., Biasi, F., Slater, T.F., Vannini, V., and Dianzani, M.U., 1985, Activation of chloroform and related trihalomethanes to free radical intermediates in isolated hepatocytes and in the rat *in vivo* as detected by the ESR-spin trapping technique. *Chemico-biological Interactions*, 55, 303-316.

Williams, D.T., Lebel, G.L., and Benoit, F.M., 1997, Disinfection by-products in canadian drinking water. *Chemosphere*, 24, 299-316.

Yllner, S., 1971, Metabolism of chloroacetate-1-¹⁴C in the mouse. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 39, 69-80.

Table 1. Percentage of inhibition (measured after 40 minutes of incubation at 37°C) for every THM in various mixture scenarios. (All samples were measured in duplicate).

Various Mixtures¹	CHCl₃	BDCM	DBCm	TBM
THMs	99%	95%	76%	51%
TCA + THMs	100%	94%	74%	69%
DCA + THMs	96%	86%	67%	58%
MCA + THMs	90%	81%	59%	43%
MCA + DCA + THMs	100%	88%	66%	51%
MCA + TCA + THMs	96%	92%	83%	78%
DCA + TCA + THMs	100%	88%	78%	67%
CAAs ² + THMs	89%	88%	77%	67%

¹Initial Concentration: THMs (each at 40 ppm); TCA (12.2 mmol/L); DCA (15.5 mmol/L); MCA (21.2 mmol/L)

²CAAs = chloroacetic acids

Table 2. The kinetic parameter values (i.e. Michaëlis constant, K_m and maximum velocity, V_{max}) for the four THMs (9 - 140 ppm) in the absence and presence of the inhibitor TCA (12.2 mmol/L). (All samples were measured in duplicate).

THM	In absence of TCA		A	In presence of TCA		B	B/A
	K_m	V_{max}	CL_{int}	K_m	V_{max}	CL_{int}	
	$\mu\text{g/mL}^1$	$\mu\text{g/hr/mg prt}^2$	mL/hr/mg prt	$\mu\text{g/mL}^1$	$\mu\text{g/hr/mg prt}$	mL/hr/mg prt	
CHCl ₃	0.10	4.47	44.09	0.31	4.66	14.84	0.34
BDCM	0.12	5.63	46.49	0.13	4.12	30.77	0.66
DBCM	0.22	8.87	40.84	0.14	5.07	35.55	0.87
TBM	0.21	10.57	50.50	0.19	7.32	39.25	0.78

¹Apparent Michaëlis constant expressed as $\mu\text{g/mL}$ of air in the equilibration vial.

²prt: amount of proteins in the incubation mixture.

Figure legends

Figure 1. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM), each at 40 ppm (initial concentration), in the presence of TCA (12.2 mmol/L) with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.

Figure 2. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) in the presence of a quaternary mixture containing all 4 trihalomethanes (THMs) with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats (each individual THM at initial concentration of 40 ppm).

Figure 3. The *in vitro* metabolism of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM), each at 40 ppm (initial concentration), in the presence of 4-methylpyrazole (4-MP) (0.14 mmol/L) with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.

Figure 4. Lineweaver-Burk plot of (A) chloroform (CHCl_3), (B) bromodichloromethane (BDCM), (C) dibromochloromethane (DBCM) and (D) bromoform (TBM) alone and in the presence of TCA with liver microsomes from male Sprague-Dawley rats.

Figure 1

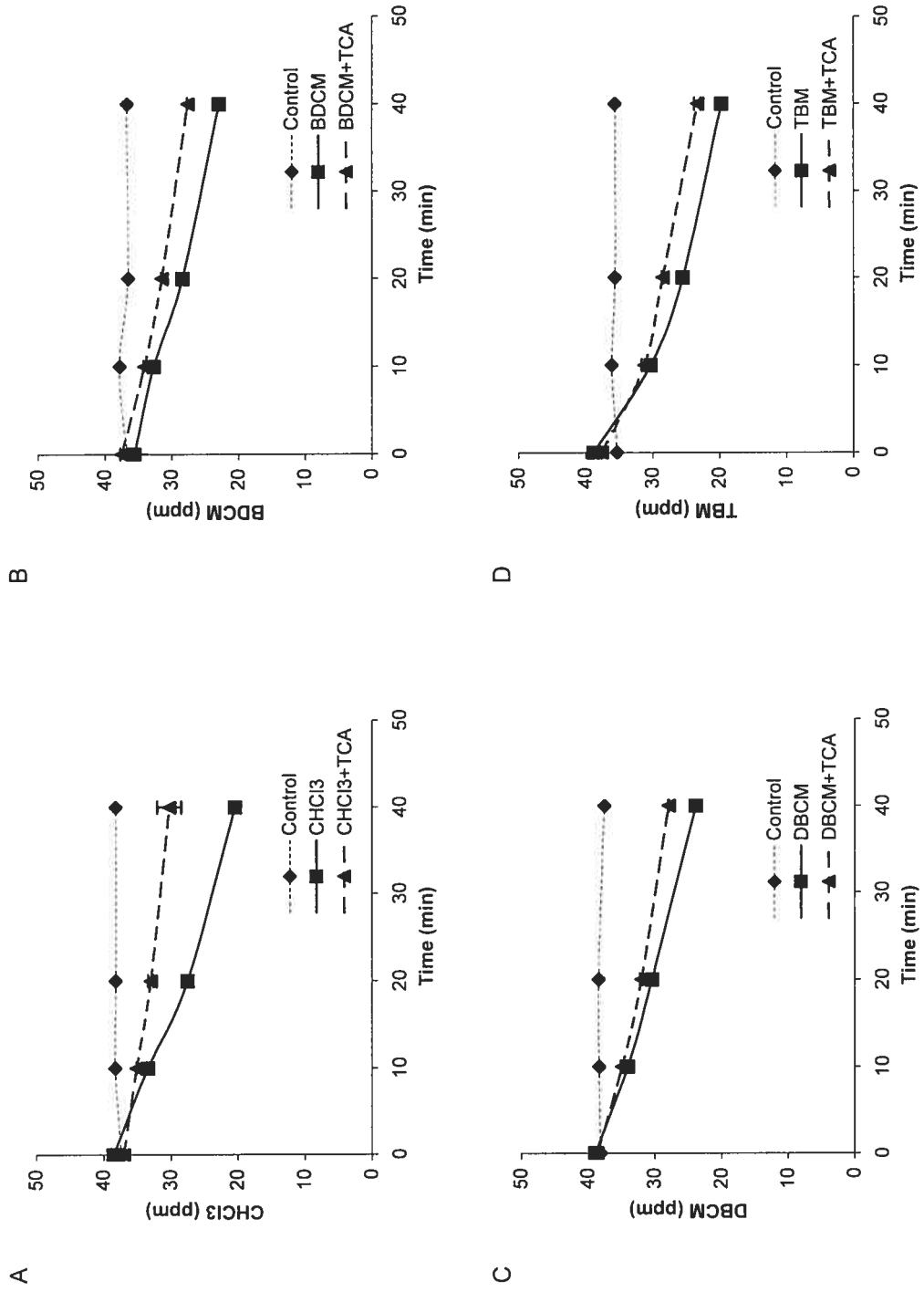
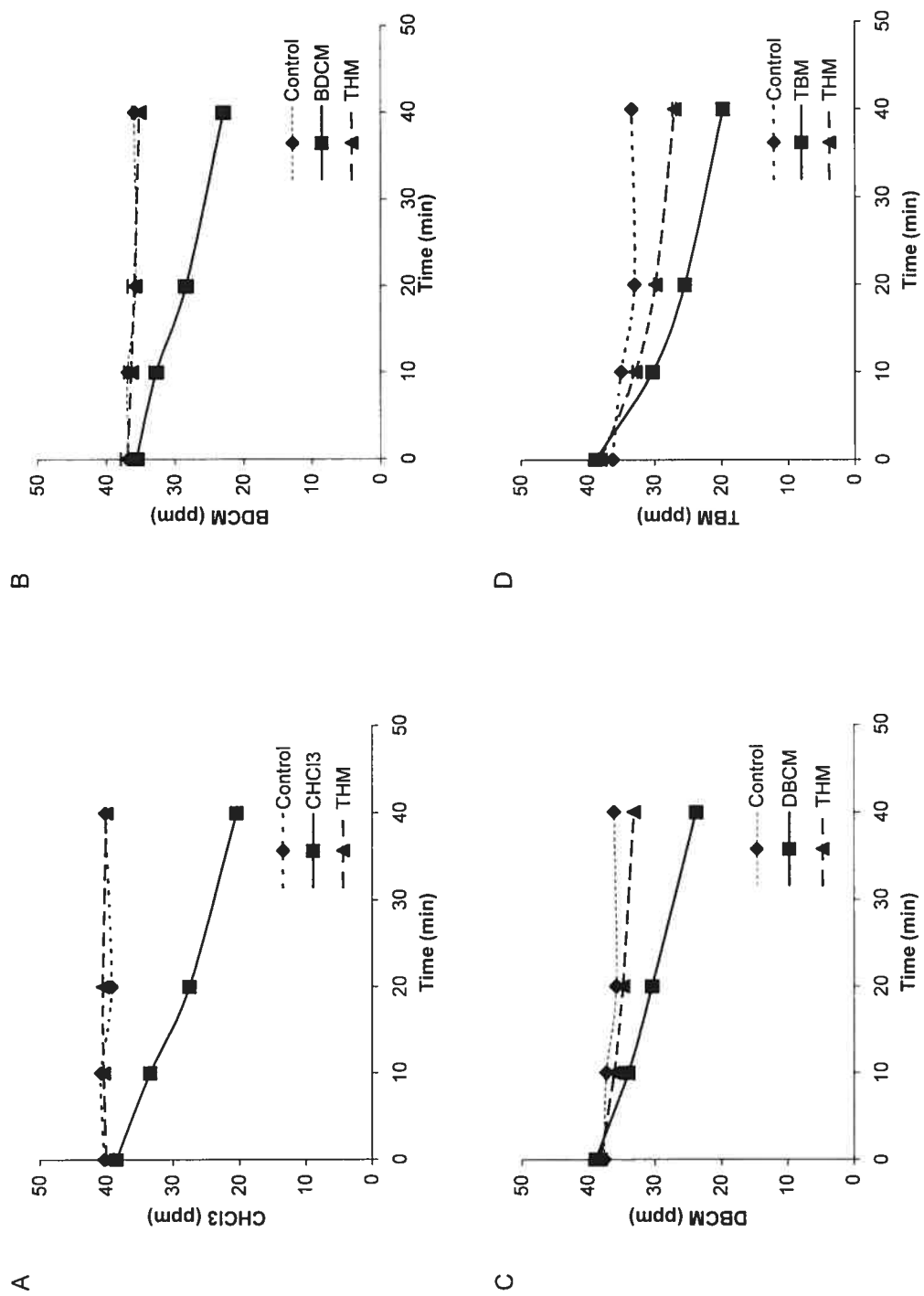


Figure 2



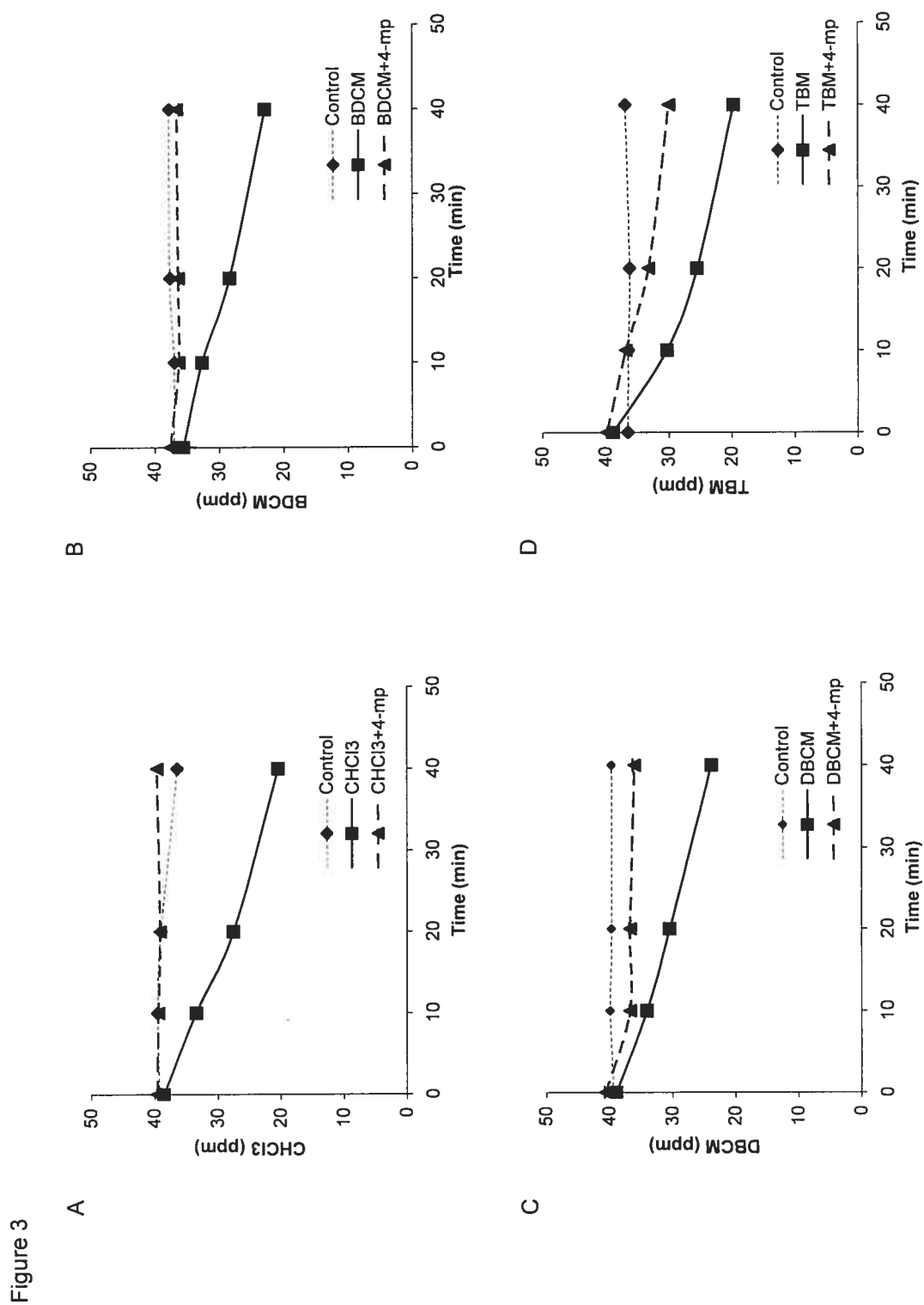
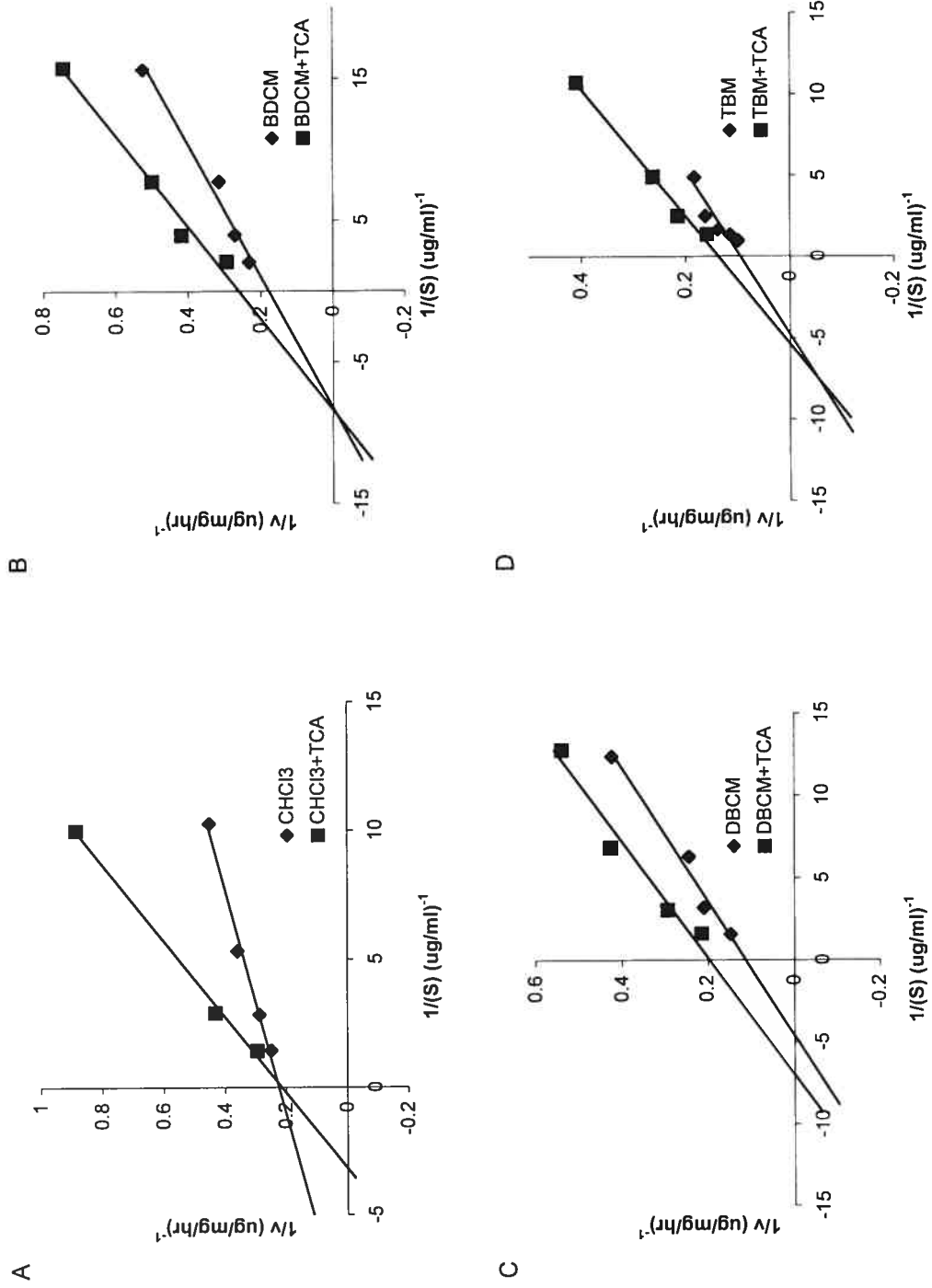


Figure 4



CHAPITRE CINQ

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE PHARMACOCINÉTIQUE À BASE
PHYSIOLOGIQUE (PBPK) CONSIDÉRENT LES INTERACTIONS
TOXICINÉTIQUES

CHAPITRE CINQ

ARTICLE IV

Abstract

The purpose of this study was to develop physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models for individual as well as mixtures of THMs following their intravenous administration using Alkamuls[®] as the vehicle. The partition coefficients of THMs in Alkamuls[®] were first evaluated in order to determine if the use of Alkamuls[®] as a vehicle during i.v. administrations could influence the transfer of THMs into blood. It was observed that the Alkamuls[®]:air partition coefficients for THMs were higher than their respective blood:air partition coefficients and subsequently, a slow, steady release of THMs from an Alkamuls[®] compartment to the venous blood compartment was hypothesized. The individual PBPK models describing a limited uptake of THMs into venous blood adequately simulated the blood concentrations in rats after single intravenous administrations of the four THMs. The zero order constants estimated for the release of the THMs were 0.80 mL/hr for chloroform, 0.65 mL/hr for both BDCM and TBM and 0.50 mL/hr for DBCM. For modeling of the quaternary mixture of THMs, the four individual models were interconnected via an interaction term describing the mechanism of interaction. Competitive inhibition best described the experimental data obtained in rats administered a quaternary mixture of THMs. Finally, the competitive inhibition that is observed during co-administration of TCA and chloroform was described by increasing the K_m of chloroform from 0.422 to 6.0 mg/L. The non-competitive inhibition that is observed during co-administration of TCA and the three brominated THMs was described by decreasing the V_{max} from 8.01 to 2.5 mg/hr/kg for BDCM, from 13.7 to 4.5 mg/hr/kg for DBCM and from 10.4 to 5.5 mg/hr/kg for TBM. The PBPK model simulations obtained in this study are consistent with the experimentally observed kinetics of THMs in mixtures, and this mixture PBPK model should be useful as a tool to explore the extent of interactions at various doses, exposure routes and exposure pathways of THMs.

Introduction

Trihalomethanes [THMs: chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (BDCM), dibromochloromethane (DBCM), and bromoform (TBM)] and chloroacetic acids [monochloroacetic acid (MCA), dichloroacetic acid (DCA), and trichloroacetic acid (TCA)] are the two major families of chlorination by-products present in drinking water.

Toxicological studies have demonstrated that chloroform and bromodichloromethane increase the incidence of kidney tumors in rats and mice (Jorgenson *et al.*, 1985; Dunnick *et al.*, 1987). Dibromochloromethane increases the incidence of hepatocellular adenomas and carcinomas in mice (Dunnick *et al.*, 1985) while bromoform increases the incidence of neoplastic lesions in the large intestine of rats (NTP, 1989). As for TCA and DCA, it has been demonstrated that they both induce hepatocellular carcinomas in rodents (Bull *et al.*, 1990; DeAngelo *et al.*, 1996).

Based on evidence of carcinogenicity in animals but insufficient information regarding epidemiological data, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has classified BDCM, TBM and DCA as probable human carcinogens. Chloroform has also been classified as a probable carcinogen in humans but under high exposure conditions only while DBCM and TCA have been classified as possible human carcinogens due to limited toxicological data and insufficient human data (USEPA, 2002a, b, c, 2003).

The Canadian recommendation for disinfection by-products is a provisional maximum allowable concentration (MAC) of 100 $\mu\text{g/L}$ for the sum of the four most prevalent THMs. No MAC has been established for chloroacetic acids in Canada yet. The World Health Organization has established MACs for the four THMs and two of the chloroacetic acids as follows: 200 $\mu\text{g/L}$ for chloroform, 60 $\mu\text{g/L}$ for BDCM, 100 $\mu\text{g/L}$ for DBCM, TBM and TCA and, 50 $\mu\text{g/L}$ for DCA (WHO, 1996).

In Canada, the annual mean concentration for total THMs is usually inferior to 60 µg/L (Santé Canada, 1993). Chloroacetic acids are not routinely investigated in municipalities. TCA concentrations, measured in a Canadian survey in 1993, ranged from 27.8 to 56.7 µg/L. Corresponding DCA concentrations ranged from 13.2 to 21.1 µg/L. MCA was present at much lower levels (Williams *et al.*, 1997). The co-occurrence of THMs and chloroacetic acids in drinking water makes it essential to consider disinfection by-products as a mixture.

Previous studies have demonstrated that interactions do occur between chloroacetic acids and THMs. *In vivo* studies have demonstrated that TCA affected the toxicokinetics of all four THMs by reducing their blood clearance while DCA and MCA only affected two of the four THMs (St-Pierre *et al.*, 2003). On the contrary, none of the four THMs modified the kinetics of TCA and DCA (St-Pierre *et al.*, 2004a). The interaction between TCA and the THMs was also reported in *in vitro* studies using rat microsomes. TCA inhibited CHCl₃ via competitive mechanism while it inhibited the three brominated THMs via non-competitive mechanism. For DCA and MCA, the interaction with THMs was not observed under *in vitro* conditions (St-Pierre *et al.*, 2004b). Chloroform, BDCM and TCA are all substrates of P450 2E1 (Nakajima *et al.*, 1995; Ni *et al.*, 1996; Testai *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 1997).

The current approach in risk assessment for mixtures is based exclusively on additivity of the doses in the case of systemic toxicants or additivity of the responses in the case of carcinogens. This approach does not take into account the possible interactions between the components of the mixture. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling has proven to be a useful tool in the risk assessment context because it allows to consider the impact of pharmacokinetic interactions on the internal dose of each constituent of a mixture (Tardif *et al.*, 1997; Haddad *et al.*, 1998, 1999). PBPK models for mixtures correspond to a set of individual chemical models interconnected via the mechanism of interactions. In the case of metabolic inhibition, a term describing the quantitative manner in which K_m and V_{max}

are modified is included in the model (Haddad and Krishnan, 1998). Such models have not been developed for mixtures of THMs, and if available they can facilitate the extrapolation and prediction of the extent of interactions among THMs at various doses, exposure scenarios and pathways. Similarly, the interaction between TCA and THMs has also not been modeled yet.

The objective of this study was therefore to develop PBPK models for simulating the kinetics of THMs following their intravenous administration individually or as a mixture in the presence or absence of TCA. Experimental data previously collected in male Sprague-Dawley rats were modeled, and in these studies, THMs were administered using Alkamuls[®] as the vehicle. The determination of THM solubility in Alkamuls[®] and the successful description of THM release from Alkamuls[®] were attempted initially, before attempting the development of a mixture model for THMs.

Materials and Methods

Chemical

Chloroform (99.9%), BDCM (98%), DBCM (98%) and TBM (99%) were all purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Alkamuls[®] was obtained from Rhodia (Cranbury, NJ).

Partition coefficients in Alkamuls[®]

Partition coefficients of THMs in Alkamuls[®] were investigated because in previous *in vivo* experiments, where THMs were administered in Alkamuls[®] via the intravenous route, maximal THM concentrations in blood were observed after a certain delay (St-Pierre *et al.*, 2003). Alkamuls[®]:air partition coefficient ($P_{e:a}$) for each THM was determined by the vial equilibration technique described by Gargas *et al.* (1989). Empty vials and vials containing Alkamuls[®] were first incubated at 37°C for 15 minutes. One millilitre of air containing a concentration of 6000 ppm of a THM was then injected in the empty vials as well as in the vials containing Alkamuls[®] (10%). All vials were then incubated at 37°C until THM concentration reached equilibrium. Air concentrations of THMs were determined by headspace analysis using a Tekmar[®] headspace autosampler and a Hewlett Packard 5890A gas chromatograph (GC) with a 30 m capillary column (HP-608) and a flame ionisation detector (FID). The carrier gas used was helium. The flow of the carrier gas was set at 2.0 mL/min and the initial column temperature was set at 80°C for 5 minutes. Retention times for CHCl₃, BDCM, DBCM, and TBM were 1.42, 1.88, 2.71, and 4.26 minutes, respectively. All samples were prepared in 5 replicates. The Alkamuls[®]:air partition coefficients ($P_{e:a}$) were then divided by the blood:air partition coefficients ($P_{b:a}$) in order to obtain the Alkamuls[®]:blood partition coefficients ($P_{e:b}$) for the four THMs.

Model development

The PBPK models published by Da Silva *et al.* (1999) for individual THMs were modified to describe intravenous administrations in Alkamuls[®]. Tissue compartments included liver, kidney, fat, richly perfused tissues, and poorly perfused tissues interconnected by an arterial blood compartment and a venous blood compartment (Figure 1). All physiological parameters, partition coefficients and metabolic rate constant values were obtained from Da Silva *et al.* (1999). The i.v. bolus administration was estimated to take 18 seconds. A vehicle compartment was added in the model and the Alkamuls[®]:blood partition coefficients ($P_{e:b}$) of the four THMs were included as parameters. The slow, steady release of THMs from Alkamuls[®] to blood was described using a zero order input into the venous blood compartment. The zero order constant for each THM was derived by visual fitting of the model simulations to experimental data on venous blood concentrations obtained in rats administered a single i.v. dose of 0.03125 and 0.125 mmol/kg of each THM (St-Pierre *et al.*, 2003).

For the development of the PBPK model for the quaternary mixture, the individual THM models were interconnected via interaction terms describing metabolic inhibition (i.e. alternate descriptions of competitive, non-competitive and uncompetitive inhibitions) in the liver compartment. The metabolic inhibition constants (K_i) for all the binary interactions between THMs were obtained by optimization of the experimental data on venous blood concentrations of rats following binary exposures of THMs.

In the present study, it was not necessary to develop a model for TCA since previous experimental data indicated that TCA is slowly cleared from the blood in the first 4 to 6-hour period following intravenous administration (St-Pierre *et al.*, 2003). TCA concentration in blood remains relatively stable during this period, such that rate equations describing its temporal change in concentrations were not required. The impact of TCA on THMs was

modeled by modifying the V_{\max} and K_m values, reflective of the nature of the inhibitory effect of TCA on THM metabolism in liver.

Model simulation

All simulations were obtained by solving a series of mass balance differential equations representing the PBPK models using a commercially-available software known as ACSL[®] (Advanced Continuous Simulation Language, AEGIS Simulation, Inc., Huntsville, AL.) (see Appendix A). The PBPK models for individual THMs were used to simulate kinetics following single administrations of 0.03125 mmol/kg and 0.125 mmol/kg of each THM in rats. The PBPK model for the quaternary mixture of THMs was used to simulate an i.v. administration of a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs (total dose of 0.125 mmol/kg). For the binary mixtures of THM-TCA, the PBPK models were used to simulate the modification in the blood kinetics of THMs resulting from metabolic inhibition by TCA. The PBPK models for individual THMs were initially run with the original V_{\max} and K_m values (Da Silva *et al.*, 1999). For chloroform, the model was rerun with an increased K_m value in order to describe competitive inhibition that is observed during co-administration with TCA. For the three brominated compounds, the models were rerun with decreased V_{\max} values in order to describe non-competitive metabolic inhibition that is observed during co-administration with TCA.

Results

The Alkamuls[®]:air partition coefficients ($P_{e:a}$) for each THM as well as the Alkamuls[®]:blood partition coefficients ($P_{e:b}$) are listed in Table 1. The blood:air partition coefficient ($P_{b:a}$) for each THM are also presented for comparison purposes. An increase of the $P_{e:a}$ can be observed in the following order: $\text{CHCl}_3 > \text{BDCM} > \text{DBCM} > \text{TBM}$. TBM had the highest Alkamuls[®]:blood partition coefficient ($P_{e:b}$) while DBCM had the lowest $P_{e:b}$.

The zero order constants and the metabolic rate constants (V_{\max} and K_m) that were estimated during the development of the PBPK model for i.v. administrations of THMs are presented in Table 2. The zero order constant can be viewed as the release of the THM from Alkamuls[®] to blood. Chloroform would appear to be the most rapidly released THM from Alkamuls[®] into systemic circulation while DBCM was the THM that was released the most slowly.

Figure 2 presents the comparison of PBPK model simulations for individual THMs with the experimental data obtained in rats administered a single i.v. dose of 0.03125 mmol/kg and 0.125 mmol/kg of each THM (St-Pierre *et al.*, 2003). The two simulation lines correspond to the high and low doses for the single chemical exposure scenarios.

Figure 3 presents the comparison of PBPK model simulations with the experimental data obtained in rats administered a quaternary mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs (St-Pierre *et al.*, 2003). One simulation line corresponds to the single chemical exposure scenario whereas the other corresponds to the quaternary mixture scenario. The interaction term that best described the experimental data was competitive inhibition. The inhibition constants are listed in Table 3.

Figure 4 presents the comparison of PBPK model simulations with the experimental data obtained in rats administered a binary mixture containing

0.125 mmol/kg of a THM plus 0.125 mmol/kg of TCA (St-Pierre *et al.*, 2003). Again, two simulation lines are presented for each THM, one corresponding to the single chemical exposure scenario and the other to the binary mixture scenario. In order to describe the competitive inhibition that is observed during co-administration of TCA and chloroform, the K_m was increased from 0.422 to 6.0 mg/L. The non-competitive inhibition that is observed during co-administration of TCA and the three brominated THMs was described by decreasing the V_{max} from 8.01 to 2.5 mg/hr/kg for BDCM, from 13.7 to 4.5 mg/hr/kg for DBCM and from 10.4 to 5.5 mg/hr/kg for TBM.

Discussion

Several disinfection by-products co-occur and may interact at the toxicokinetic or toxicodynamic level. Previous studies have shown that competitive inhibition is likely to occur among THMs during co-exposures, and that TCA interferes with the hepatic clearance of THMs. Whereas competitive inhibition is the likely mechanism of TCA-chloroform interaction, non-competitive inhibition appears to be the basis of interaction between TCA and brominated THMs. The modeling of the kinetics of THMs in mixtures, on the basis of interaction mechanisms, has never been undertaken. The present study, for the first time, developed a modeling framework to simulate the kinetics of THMs present individually, or as mixtures. The study has also, for the first time, modeled the inhibitory effect of TCA on the metabolism of THMs using a novel approach. These contributions were developed following the successful mathematical description of the absorption of THMs from Alkamuls[®], which in itself was challenging.

The Alkamuls[®]:air partition coefficients ($P_{e:a}$), determined in this study, were higher than the blood:air partition coefficients ($P_{b:a}$) for all four THMs but followed the same order: $\text{CHCl}_3 < \text{BDCM} < \text{DBCM} < \text{TBM}$. In the case of DBCM, the $P_{e:a}$ was practically the same as the $P_{b:a}$ indicating that Alkamuls[®] had a lesser effect on this particular THM than on the others.

Previous studies have demonstrated that Alkamuls[®] (formally known as Emulphor[®]) was a good vehicle for the oral administrations of THMs to rodents because, contrary to corn oil, it does not interfere with the kinetics of the compounds (Lilly *et al.*, 1994; Sanzgiri *et al.*, 1997). However, there has been no information regarding the intravenous administrations of THMs in Alkamuls[®]. It is possible that Alkamuls[®] causes retention of the THMs when administered intravenously, resulting in a slow release or slow transfer of the THMs into the circulation. This speculation was first made in previous *in vivo* experiments where maximal THM concentrations (C_{max}) in

blood were observed only after the 20-minute blood sampling following the intravenous administrations (St-Pierre *et al.*, 2003). This effect is more marked in the case of brominated THMs.

The initial perfusion-limited PBPK model for THMs developed by Da Silva *et al.* (1999) could not be used directly in this study. It did not allow an accurate description of the experimentally-observed venous blood concentrations of THMs after intravenous administrations. Based on evidence obtained from the partition coefficients in Alkamuls[®], a slow, steady release of THMs from Alkamuls[®] to blood was hypothesized. The PBPK model describing the limited uptake into venous blood adequately simulated the blood concentrations in rats after intravenous administrations of THMs. The model assumes that a transfer of THMs occurs from Alkamuls[®] to blood. Chloroform was the compound that was released the most rapidly from Alkamuls[®] phase (following i.v. bolus) into the blood circulation while DBCM was the slowest.

For the modeling of the quaternary mixture of THMs, competitive inhibition best described the experimentally-observed venous blood concentrations in rats after intravenous administration of a mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs. Previous *in vivo* studies have suggested a possible metabolic inhibition between THMs following oral exposures to mixtures of THMs, which resulted in significantly higher blood concentrations in rats (Da Silva *et al.*, 1999, 2000). Mutual metabolic interaction in binary and quaternary mixtures of THMs was confirmed in subsequent *in vitro* studies (St-Pierre *et al.*, 2004b). The reciprocal inhibition observed between THMs makes it is reasonable to suspect competitive inhibition as the plausible mechanism of interaction.

In vivo and *in vitro* experiments have clearly demonstrated that TCA interferes in the elimination of THMs by inhibiting their metabolism (St-Pierre *et al.*, 2003, 2004b). The inhibition exerted by TCA over THMs was described mathematically in the binary mixture scenarios. It has been

shown that TCA inhibits chloroform via a competitive mechanism (St-Pierre *et al.*, 2004b). This inhibition by TCA was mathematically described by an increase of the Michaëlis affinity constant (K_m) by a factor of 14. In the case of the brominated compounds, the non-competitive inhibition by TCA (St-Pierre *et al.*, 2004b) was described by a decrease in the maximal velocity (V_{max}) for hepatic metabolism. BDCM and DBCM were inhibited by TCA in a similar way; their V_{max} was reduced by a factor of 3. The V_{max} of TBM was reduced by a factor of 2. This approach of modifying the K_m and V_{max} values, as a function of the mechanism, represents an original and simple way of modeling interactions in mixtures. This approach is specifically useful in cases where the free concentration of the competitor does not fluctuate very much (e.g., TCA).

PBPK modeling of mixtures is a useful tool in risk assessment because it enables the species, dose, route, and scenario extrapolations of the occurrence of toxicokinetic interactions between the components of the mixture (Haddad and Krishnan, 1998). Efforts now have to be concentrated on the development of a human PBPK model that would include all routes of exposure to THMs and TCA. That should facilitate a comprehensive assessment of the internal dose and health risks associated with human exposure to THMs and TCA in drinking water.

Acknowledgements

This work was supported by the Toxic Substances Research Initiative (TSRI) of Health Canada and Environment Canada.

References

- Bull R.J., Sanchez I.M., Nelson M.A., Larson J.L., and Lansing A.J. (1990). Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology* **63**, 341-359.
- Da Silva M.L., Charest-Tardif G., Krishnan K., and Tardif R. (1999). Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethanes on their blood kinetics. *Toxicology Letters* **106**, 49-57.
- Da Silva M.L., Charest-Tardif G., Krishnan K., and Tardif R. (2000). Evaluation of the pharmacokinetic interactions between orally administered trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **60**, 343-353.
- DeAngelo A.B., Daniel F.B., Most B.M., and Olson G.R. (1996). The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fisher 344 rat. *Toxicology* **114**, 207-221.
- Dunnick J.K., Eustis S.L., and Lilja H.S. (1987). Bromodichloromethane, a trihalomethane that produces neoplasms in rodents. *Cancer Research* **47**, 5189-5193.
- Dunnick J.K., Haseman J.K., Lilja H.S., and Wyand S. (1985). Toxicity and carcinogenicity of chlorodibromomethane in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**, 1128-1136.
- Gargas M.L., Burgess R.J., Voisard D.E., Cason G.H., and Andersen M.E. (1989). Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* **98**, 87-99.
- Haddad S., and Krishnan K. (1998). Physiological modeling of toxicokinetic interactions: implications for mixture risk assessment. *Environmental Health Perspective* **106**, 1377-1384.

Haddad S., Tardif R., Charest-Tardif G., and Krishnan K. (1999). Physiological modeling of the toxicokinetic interactions in a quaternary mixture of aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **161**, 249-257.

Jorgenson T.A., Meierhenry E.F., Rushbrook C.J., Bull R.J., and Robinson M. (1985). Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**, 760-769.

Lilly P.D., Andersen M.E., Ross T.M., and Pegram R.A. (1997). Physiologically based estimation of *in vivo* rates of bromodichloromethane metabolism. *Toxicology* **124**, 141-152.

Lilly P.D., Simmons J.E., and Pegram R.A. (1994). Dose-dependent vehicle differences in the acute toxicity of bromodichloromethane. *Fundamental and Applied Toxicology* **23**, 132-140.

Nakajima T., Elovaara E., Okino T., Gelboin H.V., Klockars M., Riihimäki V., Aoyama T., and Vainio H. (1995). Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **133**, 215-222.

Ni Y.-C., Wong T.-Y., Lloyd R.V., Heinze T.M., Shelton S., Casciano D., Kadlubar F.F., and Fu P.P. (1996). Mouse liver microsomal metabolism of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol leading to induction of lipid peroxidation via a free radical mechanism. *Drug Metabolism and Disposition* **24**, 81-90.

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of tribromomethane (bromoform) (CAS No. 75-25-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). TR-350. 1989. Report.

Santé Canada. Les trihalométhanes. 1-16. 1993. Santé Canada.

Sanzgiri U.Y., and Bruckner J.V. (1997). Effect of Alkamuls[®], an emulsifier, on the pharmacokinetics and hepatotoxicity of oral carbon tetrachloride in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology* **36**, 54-61.

St-Pierre A., Krishnan K., and Tardif R. (2003). Evaluation of the influence of chloroacetic acids on the pharmacokinetics of trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* **66**, 2267-2280.

St-Pierre A., Krishnan K., and Tardif R. (2004a). Evaluation of the influence of trihalomethanes on the pharmacokinetics of chloroacetic acids in the rat. Submitted to *Xenobiotica*.

St-Pierre A., Krishnan K., and Tardif R. (2004b). Characterization of the metabolic interaction between trihalomethanes and chloroacetic acids using rat liver microsomes. Submitted to *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*.

Tardif R., Charest-Tardif G., Brodeur J., and Krishnan K. (1997). Physiologically based pharmacokinetic modeling of a ternary mixture of alkyl benzenes in rats and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144**, 120-134.

Testai E., De Curtis V., Gemma S., Fabrizi L., Gervasi P., and Vittozzi L. (1996). The role of different cytochrome P450 isoforms in in vitro chloroform metabolism. *Journal of Biochemical Toxicology* **11**, 305-312.

USEPA. (2003). Chloroform. CASRN 67-66-3. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0025.htm

USEPA. (2002a). Bromodichloromethane. CASRN 75-27-4. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0213.htm

USEPA. (2002b). Dibromochloromethane. CASRN 124-48-1. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0535.htm

USEPA. (2002c). Bromoform. CASRN 75-25-2. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0214.htm

WHO. Guidelines for drinking water quality. 1996. WHO. Geneva.

Williams D.T., LeBel G.L., and Benoit F.M. (1997). Disinfection by-products in Canadian drinking water. *Chemosphere* **34**, 299-316.

Table 1. Blood:air ($P_{b:a}$), Alkamuls[®]:air ($P_{e:a}$) and Alkamuls[®]:blood ($P_{e:b}$) partition coefficients for the four THMs (mean \pm SD).

THM	$P_{b:a}$ (A)	$P_{e:a}$ (B)	$P_{e:b}$ (B/A)
Chloroform	20.8	25.09 \pm 1.00	1.21
BDCM	31.4	45.14 \pm 1.95	1.44
DBCM	116.0	122.41 \pm 3.98	1.05
TBM	198.1	371.76 \pm 13.35	1.88

Table 2. Zero order constants and metabolic rate constants (K_m and V_{max}) estimated in the PBPK model for the four THMs.

THM	Zero order constant mL/hr	K_m mg/L	V_{max} mg/hr/kg
Chloroform	0.80	0.422	9.31
BDCM	0.65	0.302	8.01
DBCM	0.50	0.72	13.7
TBM	0.65	0.42	10.4

Table 3. Metabolic inhibition constants (K_i) estimated for all the binary interactions between THMs.

INTERACTION	Chloroform	BDCM	DBCM	TBM
Chloroform	-	0.117	0.245	0.057
BDCM	0.295	-	0.236	0.326
DBCM	0.115	0.071	-	0.273
TBM	0.880	0.106	0.394	-

Figure legends

Figure 1. Conceptual representation of the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for intravenous administrations of individual THMs.

Figure 2. Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following single intravenous administrations of 0.03125 mmol/kg or 0.125 mmol/kg of each THM. Data (symbols) were collected in a previous study (St-Pierre *et al.*, 2003) and represent means (\pm SE) for five rats.

Figure 3. Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following intravenous administrations of either 0.03125 mmol/kg of each THM or a quaternary mixture containing 0.03125 mmol/kg of each of the four THMs. Data (symbols) were collected in a previous study (St-Pierre *et al.*, 2003) and represent means (\pm SE) for five rats.

Figure 4. Comparison of experimental data (symbols) and PBPK model simulations (solid lines) of venous blood concentrations of chloroform, BDCM, DBCM and TBM in rats following intravenous administrations of either 0.125 mmol/kg of each THM or a binary mixture containing 0.125 mmol/kg of TCA and 0.125 mmol/kg of a THM. Data (symbols) were collected in a previous study (St-Pierre *et al.*, 2003) and represent means (\pm SE) for five rats.

Figure 1

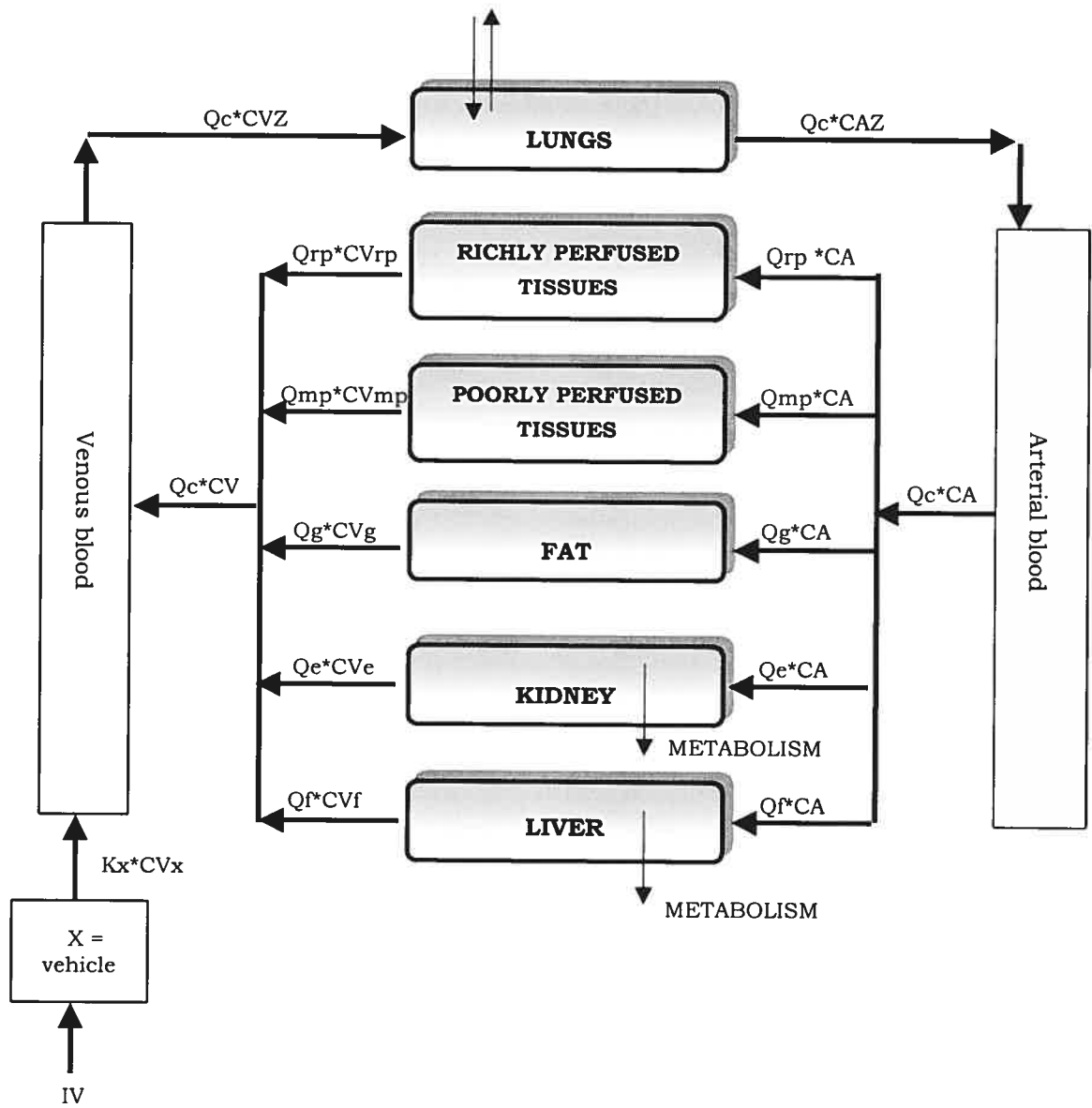
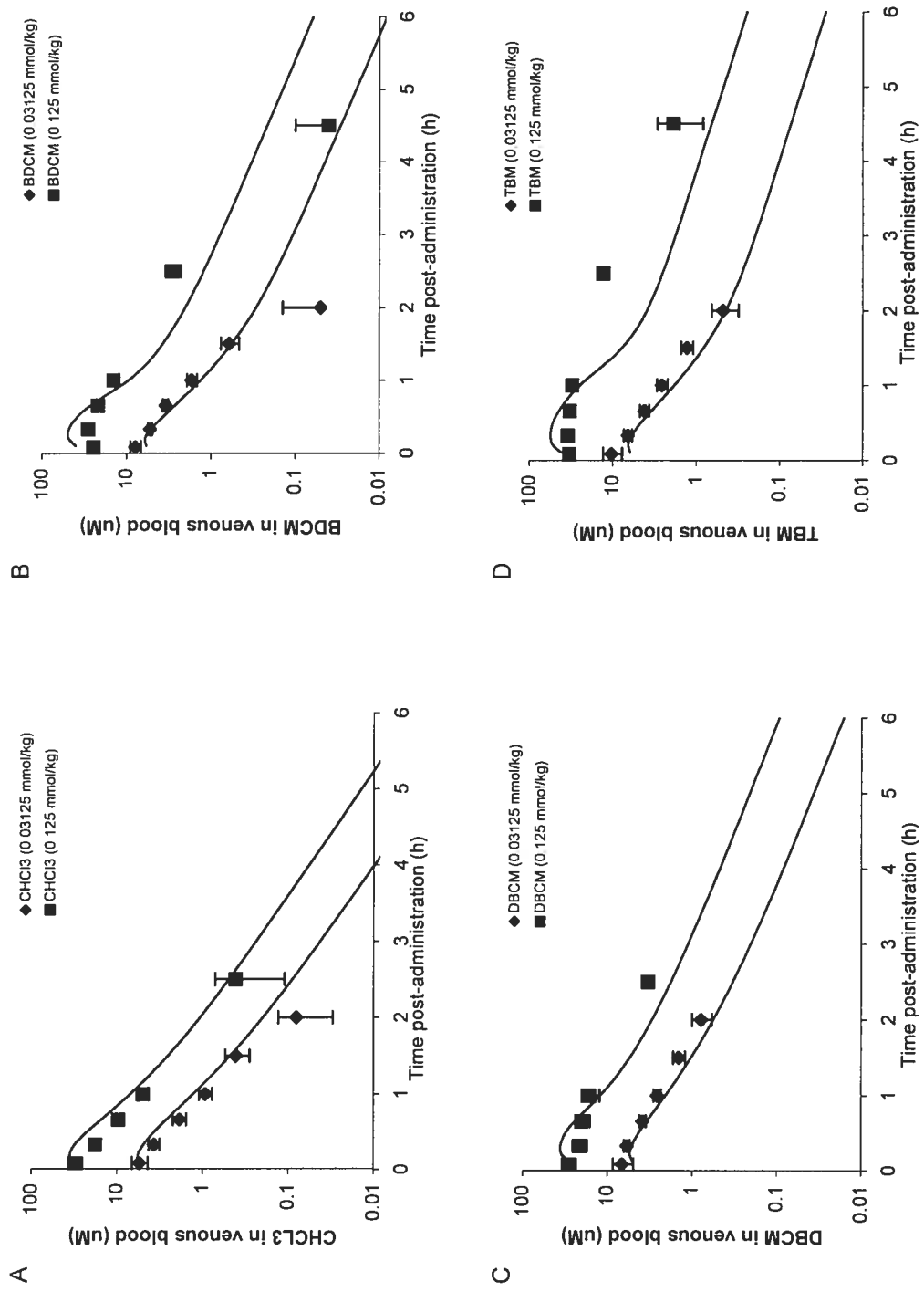


Figure 2



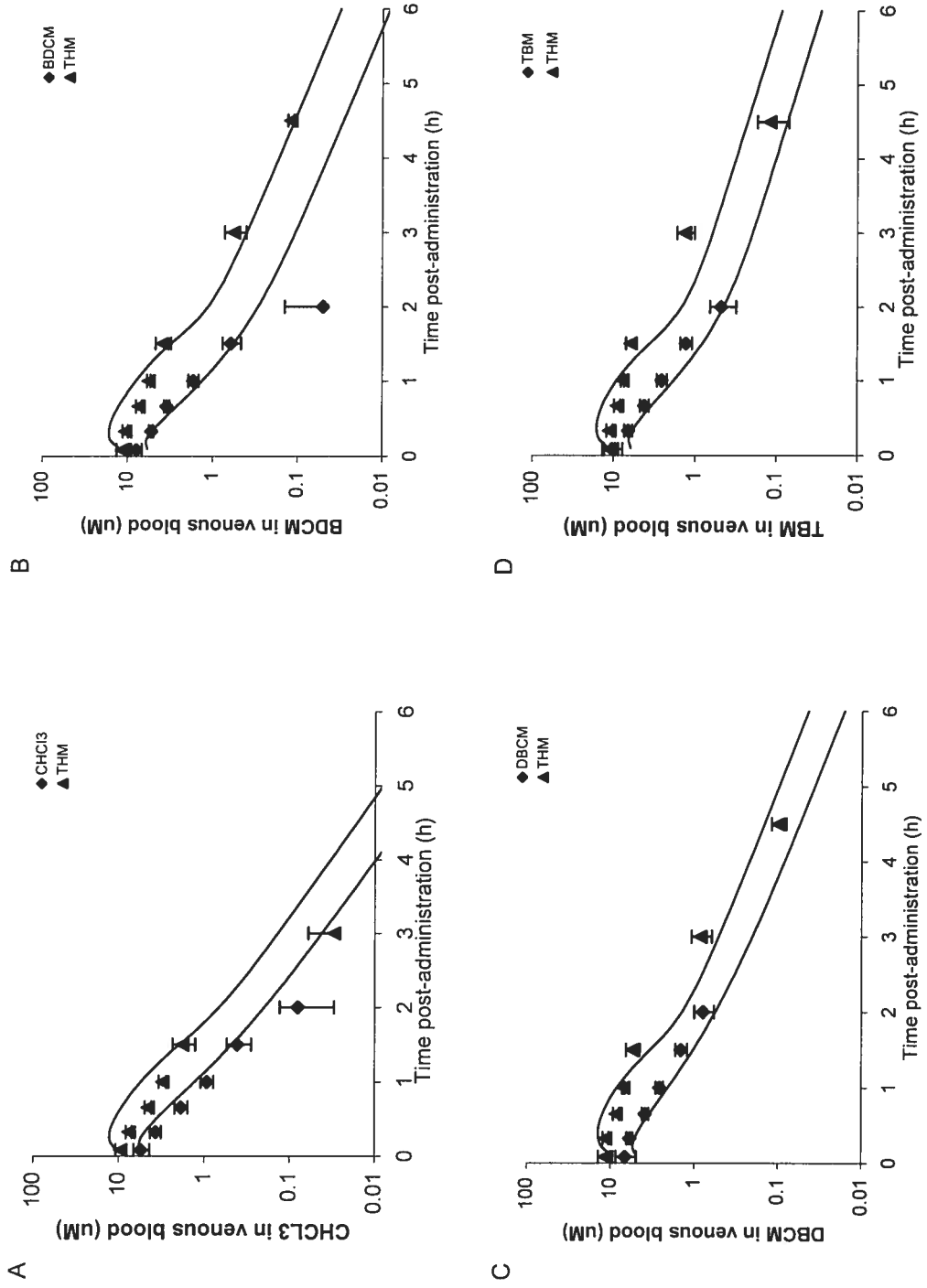
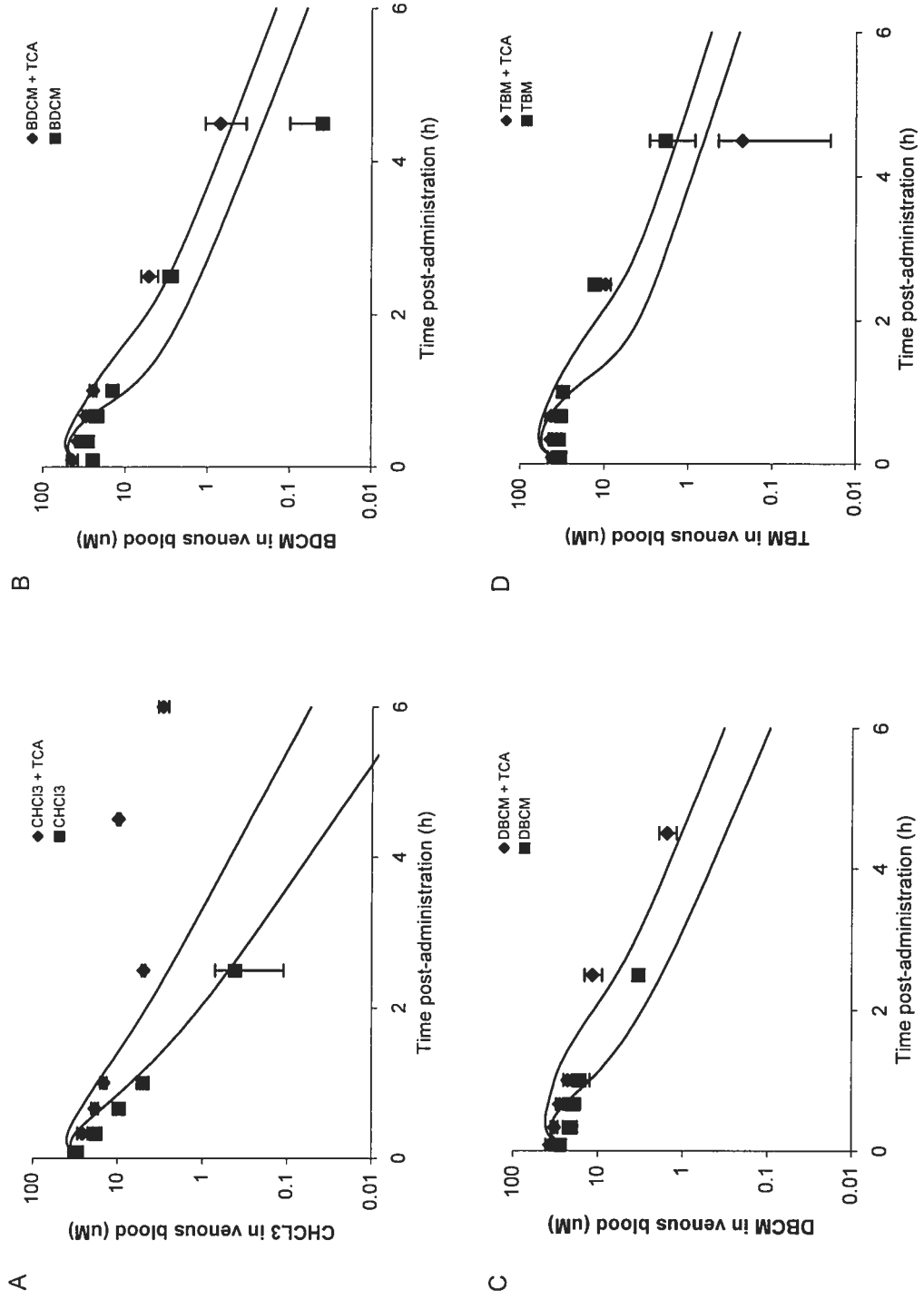


Figure 3

Figure 4



Appendix A

PROGRAM: PB-PK model for THMs in rat
 'Model simulation: CHCl3 + BrCHCl2 + ClCHBr2 + CHBr3'
 'Compartments : liver, kidney, lung, fat, richly perfused tissues
 (rpt), poorly perfused tissues (ppt)'
 '3 types of inhibition'

Adapted from Da Silva *et al.*, 1999

INITIAL \$'Constants for a rat'

'Physiological parameters'

CONSTANT BW = 0.250 ! Body weight (kg)
 CONSTANT KQCR = 15 ! Cardiac output at rest (L/hr/kg)
 CONSTANT KQALVR = 15 ! Alveolar output at rest (L/hr/kg)

'Volumes'

CONSTANT KVF = 0.0253 ! Liver fraction
 CONSTANT KVE = 0.0071 ! Kidney fraction
 CONSTANT KVG = 0.063 ! Fat fraction
 CONSTANT KVR = 0.0439 ! Richly perfused tissues fraction
 CONSTANT KVMP = 0.7707 ! Poorly perfused tissues fraction
 CONSTANT KVB = 0.0662 ! Total blood fraction

'Flow'

CONSTANT KQF = 0.25 ! Fraction - blood flow to liver ((L/hr)/QC)
 CONSTANT KQE = 0.25 ! Fraction - blood flow to kidney
 ((L/hr)/QC)
 CONSTANT KQG = 0.05 ! Fraction - blood flow to fat ((L/hr)/QC)
 CONSTANT KQR = 0.26 ! Fraction - blood flow to rpt (L/hr)/QC)
 CONSTANT KQMP = 0.19 ! Fraction - blood flow to ppt ((L/hr)/QC)

'Physico-chemical parameters for chloroform'

CONSTANT PRBa = 20.8 ! Blood/air partition coefficient
 CONSTANT KPRFa = 21.1 ! Liver/air partition coefficient
 CONSTANT KPREa = 11.0 ! Kidney/air partition coefficient
 CONSTANT KPRGa = 203.0 ! Fat/air partition coefficient
 CONSTANT KPRRa = 21.1 ! RPT/air partition coefficient
 CONSTANT KPRMPa = 13.9 ! PPT/air partition coefficient
 CONSTANT PMa = 119.4 ! Molecular weight (g/mol)
 CONSTANT KVMAXa = 9.31 ! Max velocity of metabolism (mg/hr/kg)
 CONSTANT KMa1 = 0.422 ! Michaelis-Menten constant (mg/L)
 CONSTANT KMa2 = 0.422 ! M-M constant at end of SIM (mg/L)
 CONSTANT TVMa = 1.0 ! Time to reach KMa2 (hr)
 CONSTANT Kiab = 0.117 ! Inhibition constant CHCl3 on BDCM
 CONSTANT Kiac = 0.245 ! Inhibition constant CHCl3 on DBCM
 CONSTANT Kiad = 0.057 ! Inhibition constant CHCl3 on TBM
 CONSTANT APROa = 0.052 ! Proport. constant: liver - kidney

'Physico-chemical parameters for BDCM'

CONSTANT PRBb = 31.4 ! Blood/air partition coefficient
 CONSTANT KPRFb = 30.6 ! Liver/air partition coefficient
 CONSTANT KPREb = 32.9 ! Kidney/air partition coefficient
 CONSTANT KPRGb = 526.0 ! Fat/air partition coefficient
 CONSTANT KPRRb = 30.6 ! RPT/air partition coefficient

```

CONSTANT   KPRMPb = 12.4      ! PPT/air partition coefficient
CONSTANT   PMb = 163.83      ! Molecular weight (g/mol)
CONSTANT   KVM1b = 8.01      ! Max velocity of metabolism (mg/hr/kg)
CONSTANT   KVM2b = 8.01      ! Max velo met at end of SIM (mg/hr/kg)
CONSTANT   TVMb = 1.0        ! Time to reach KVM2b (hr)
CONSTANT   KMb = 0.302       ! Michaelis-Menten constant (mg/L)
CONSTANT   Kiba = 0.295      ! Inhibition constant BDCM on CHCl3
CONSTANT   Kibc = 0.236      ! Inhibition constant BDCM on DBCM
CONSTANT   Kibd = 0.326      ! Inhibition constant BDCM on TBM
CONSTANT   APROb = 0.052     ! Proport. constant: liver - kidney

```

'Physico-chemical parameters for DBCM'

```

CONSTANT   PRBc = 116.0      ! Blood/air partition coefficient
CONSTANT   KPRFc = 126.0     ! Liver/air partition coefficient
CONSTANT   KPREc = 126.0     ! Kidney/air partition coefficient
CONSTANT   KPRGc = 1917.0    ! Fat/air partition coefficient
CONSTANT   KPRRc = 126.0     ! RPT/air partition coefficient
CONSTANT   KPRMPc = 55.6     ! PPT/air partition coefficient
CONSTANT   PMc = 208.3       ! Molecular weight (g/mol)
CONSTANT   KVM1c = 13.7      ! Max velocity of metabolism (mg/hr/kg)
CONSTANT   KVM2c = 13.7      ! Max velo met at end of SIM (mg/hr/kg)
CONSTANT   TVMc = 1.0        ! Time to reach KVM2b (hr)
CONSTANT   KMc = 0.72        ! Michaelis-Menten constant (mg/L)
CONSTANT   Kica = 0.115      ! Inhibition constant DBCM on CHCl3
CONSTANT   Kicb = 0.071      ! Inhibition constant DBCM on BDCM
CONSTANT   Kicd = 0.273      ! Inhibition constant DBCM on TBM
CONSTANT   APROc = 0.0       ! Proport. constant: liver - kidney

```

'Physico-chemical parameters for TBM'

```

CONSTANT   PRBd = 198.1      ! Blood/air partition coefficient
CONSTANT   KPRFd = 210.3     ! Liver/air partition coefficient
CONSTANT   KPRED = 173.4     ! Kidney/air partition coefficient
CONSTANT   KPRGd = 4129.0    ! Fat/air partition coefficient
CONSTANT   KPRRd = 210.3     ! RPT/air partition coefficient
CONSTANT   KPRMPd = 115.1    ! PPT/air partition coefficient
CONSTANT   PMd = 252.75      ! Molecular weight (g/mol)
CONSTANT   KVM1d = 10.40     ! Max velocity of metabolism (mg/hr/kg)
CONSTANT   KVM2d = 10.40     ! Max velo met at end of SIM (mg/hr/kg)
CONSTANT   TVMd = 1.0        ! Time to reach KVM2b (hr)
CONSTANT   KMD = 0.42        ! Michaelis-Menten constant (mg/L)
CONSTANT   Kida = 0.880      ! Inhibition constant TBM on CHCl3
CONSTANT   Kidb = 0.106      ! Inhibition constant TBM on BDCM
CONSTANT   Kidc = 0.394      ! Inhibition constant TBM on DBCM
CONSTANT   APROd = 0.0       ! Proport. constant: liver - kidney

```

'Vehicle'

```

CONSTANT   KPREMa = 25.1     ! Vehicle/air part coefficient CHCl3
CONSTANT   KPREMb = 45.1     ! Vehicle/air part coefficient BDCM
CONSTANT   KPREMc = 122.4    ! Vehicle/air part coefficient DBCM
CONSTANT   KPREMd = 371.8    ! Vehicle/air part coefficient TBM

```

'Simulation parameters'

```

CONSTANT   TSTOP = 12.0      ! Hours of simulation
CONSTANT   DUREE = 4.0       ! Length of exposure (hr) - inhalation
CONSTANT   CINT = 0.005      ! Interval - results
CONSTANT   MAXT = 0.001      ! CONTROLE NO INTEGRATION
CONSTANT   INTER = 0.0       ! Type of interaction

```

```

ALGORITHM IALG = 2           ! Gear Method
CONSTANT  IVDOSA = 0.0       ! IV dose (mmole/kg) CHCl3
CONSTANT  IVDOSB = 0.0       ! IV dose (mmole/kg) BDCM
CONSTANT  IVDOSC = 0.0       ! IV dose (mmole/kg) DBCM
CONSTANT  IVDOSD = 0.0       ! IV dose (mmole/kg) TBM
CONSTANT  TINF = 0.005       ! Infusion rate (hr) 18 seconds
CONSTANT  VX = 0.00025       ! Volume of injection box (l)
CONSTANT  KXa = 0.00080      ! Flow injection box CHCl3 (L/hr)
CONSTANT  KXb = 0.00065      ! Flow injection box BDCM (L/hr)
CONSTANT  KXc = 0.00050      ! Flow injection box DBCM (L/hr)
CONSTANT  KXd = 0.00065      ! Flow injection box TBM (L/hr)

'CALCULATED PARAMETERS '
QC = KQCR*BW**0.75          ! Cardiac output (L/hr)
QALV = KQALVR*BW**0.75     ! Alveolar ventilation (L/hr)

'Volumes'
VF = KVF*BW                 ! Liver (L)
VE = KVE*BW                 ! Kidney (L)
VR = KVR*BW                 ! RPT (L)
VMP = KVMP*BW               ! PPT (L)
VG = KVG*BW                 ! Fat (L)
VB = KVB*BW                 ! Total blood (L)
VVZ = 0.66*VB               ! Venous blood (L)
VVA = 0.34*VB               ! Arterial blood (L)

'Flow'
QF = KQF*QC                 ! Blood flow in liver (L/hr)
QE = KQE*QC                 ! Blood flow in kidney (L/hr)
QR = KQR*QC                 ! Blood flow in RPT (L/hr)
QMP = KQMP*QC               ! Blood flow in PPT (L/hr)
QG = KQG*QC                 ! Blood flow in fat (L/hr)

'Metabolic constants'
Kma = KMa1 ! Starting value CHCl3 (mg/L)
TM3a = (KMa2-KMa1)/(TVMa/CINT) ! Increase of Kma (T=0 to T=TVMa)
VMAXa = KVMAXa*BW**0.7       ! CHCl3 (mg/hr)
KVMAXb = KVM1b               ! Starting value BDCM (mg/hr/kg)
VMAXb = KVMAXb*BW**0.7       ! BDCM (mg/hr)
TM3b = (KVM1b-KVM2b)/(TVMb/CINT) ! Decrease KVMAX (T=0 to T=TVMb)
KVMAXc = KVM1c               ! Starting value DBCM (mg/hr/kg)
VMAXc = KVMAXc*BW**0.7       ! DBCM (mg/hr)
TM3c = (KVM1c-KVM2c)/(TVMc/CINT) ! Decrease KVMAX (T=0 to T=TVMc)
KVMAXd = KVM1d               ! Starting value TBM (mg/hr/kg)
VMAXd = KVMAXd*BW**0.7       ! TBM (mg/hr)
TM3d = (KVM1d-KVM2d)/(TVMd/CINT) ! Decrease KVMAX (T=0 to T=TVMd)

VMEa = (VMAXa*VE*APROa)/VF    ! Max velo KIDNEY (mg/hr) CHCl3
VMEb = (VMAXb*VE*APROb)/VF    ! Max velo KIDNEY (mg/hr) BDCM
VMEc = (VMAXc*VE*APROc)/VF    ! Max velo KIDNEY (mg/hr) DBCM
VMEd = (VMAXd*VE*APROd)/VF    ! Max velo KIDNEY (mg/hr) TBM

'Partition coefficients'
PRFa = KPRFa/PRBa           ! Liver/blood part coefficient CHCl3
PREa = KPREa/PRBa           ! Kidney/blood part coefficient CHCl3
PRGa = KPRGa/PRBa           ! Fat/blood part coefficient CHCl3
PRRa = KPRRa/PRBa           ! RPT/blood part coefficient CHCl3

```

```

PRMPa = KPRMPa/PRBa      ! PPT/blood part coefficient CHCl3
PRFb = KPRFb/PRBb       ! Liver/blood part coefficient BDCM
PREb = KPREb/PRBb       ! Kidney/blood part coefficient BDCM
PRGb = KPRGb/PRBb       ! Fat/blood part coefficient BDCM
PRRb = KPRRb/PRBb       ! RPT/blood part coefficient BDCM
PRMPb = KPRMPb/PRBb     ! PPT/blood part coefficient BDCM
PRFc = KPRFc/PRBc       ! Liver/blood part coefficient DBCM
PREc = KPREc/PRBc       ! Kidney/blood part coefficient DBCM
PRGc = KPRGc/PRBc       ! Fat/blood part coefficient DBCM
PRRc = KPRRc/PRBc       ! RPT/blood part coefficient DBCM
PRMPc = KPRMPc/PRBc     ! PPT/blood part coefficient DBCM
PRFd = KPRFd/PRBd       ! Liver/blood part coefficient TBM
PREd = KPRED/PRBd       ! Kidney/blood part coefficient TBM
PRGd = KPRGd/PRBd       ! Fat/blood part coefficient TBM
PRRd = KPRRd/PRBd       ! RPT/blood part coefficient TBM
PRMPd = KPRMPd/PRBd     ! PPT/blood part coefficient TBM
PREMa = KPREMa/PRBa     ! Vehicle/blood part coefficient CHCl3
PREMb = KPREMb/PRBb     ! Vehicle/blood part coefficient BDCM
PREMc = KPREMc/PRBc     ! Vehicle/blood part coefficient DBCM
PREMd = KPREMd/PRBd     ! Vehicle/blood part coefficient TBM

```

```
'IV dose'
```

```

IVRa = (IVDOSa*BW*Pma)/TINF      ! IV dose CHCl3 (mg/hr)
IVRb = (IVDOSb*BW*Pmb)/TINF      ! IV dose BDCM (mg/hr)
IVRc = (IVDOSc*BW*Pmc)/TINF      ! IV dose DBCM (mg/hr)
IVRd = (IVDOSd*BW*Pmd)/TINF      ! IV dose TBM (mg/hr)

```

```
END $ 'End of INITIAL section'
```

```
DYNAMIC      ! Debut: dynamic section of the simulation'
```

```
"Variable VMAX of THMs during SIM / decrease of KVM1 to KVM2"
```

```
"If KVM1 = KVM2, VMAX stable during SIM"
```

```

VMAXa = KVMAXa*BW**0.7          ! Transformation in (mg/h)
IF (KVMAXb.LT.KVM2b) GO TO L2
KVMAXb = KVMAXb+(-TM3b)         ! Decrease KVMAXb at each CINT by TM3b
VMAXb = KVMAXb*BW**0.7          ! Transformation in (mg/h)
IF (KVMAXc.LT.KVM2c) GO TO L2
KVMAXc = KVMAXc+(-TM3c)         ! Decrease KVMAXc at each CINT by TM3c
VMAXc = KVMAXc*BW**0.7          ! Transformation in (mg/h)
IF (KVMAXd.LT.KVM2d) GO TO L2
KVMAXd = KVMAXd+(-TM3d)         ! Decrease KVMAXd at each CINT by TM3d
VMAXd=KVMAXd*BW**0.7           ! Transformation in (mg/h)
L2..CONTINUE

```

```
"Variable Km of THMs during SIM / increase of KM1 to KM2"
```

```
"If KM1 = KM2, KM stable during SIM"
```

```

IF (KMa.GT.KMa2) GO TO L3
KMa = KMa+(+TM3a)              ! Increase KMa at each CINT by TM3a
L3..CONTINUE

```

DERIVATIVE \$ 'Differential equations'

'Compound in injection box - Vehicle'

'CHLOROFORM'

'Injection box'

IVa = IVRa*(1-STEP(TINF)) ! Rate of CHCl3 injected IV (mg/hr)
 TAXa = IVa-(KXa*CVXa) ! Acc. rate of CHCl3 in box (mg/hr)
 AXa = INTEG(TAXa,0.) ! Quantity of CHCl3 in box (mg)
 CVXa = AXa/VX ! Concentration of CHCl3 in box (mg/L)
 CVXEa = CVXa/PREMa ! Venous conc. CHCl3 in box (mg/L)

'BROMODICHLOROMETHANE'

'Injection box'

IVb = IVRb*(1-STEP(TINF)) ! Rate of BDCM injected IV (mg/hr)
 TAXb = IVb-(KXb*CVXb) ! Acc. rate of BDCM in box (mg/hr)
 AXb = INTEG(TAXb,0.) ! Quantity of BDCM in box (mg)
 CVXb = AXb/VX ! Concentration of BDCM in box (mg/L)
 CVXEb = CVXb/PREMb ! Venous conc. BDCM in box (mg/L)

'DIBROMOCHLOROMETHANE'

'Injection box'

IVc = IVRc*(1-STEP(TINF)) ! Rate of DBCM injected IV (mg/hr)
 TAXc = IVc-(KXc*CVXc) ! Acc. rate of DBCM in box (mg/hr)
 AXc = INTEG(TAXc,0.) ! Quantity of DBCM in box (mg)
 CVXc = AXc/VX ! Concentration of DBCM in box (mg/L)
 CVXEc = CVXc/PREMc ! Venous conc. DBCM in box (mg/L)

'BROMOFORM'

'Injection box'

IVd = IVRd*(1-STEP(TINF)) ! Rate of TBM injected IV (mg/hr)
 TAXd = IVd-(KXd*CVXd) ! Acc. rate of TBM in box (mg/hr)
 AXd = INTEG(TAXd,0.) ! Quantity of TBM in box (mg)
 CVXd = AXd/VX ! Concentration of TBM in box (mg/L)
 CVXEd = CVXd/PREMd ! Venous conc. TBM in box (mg/L)

'Compound in lungs and blood'

'CHLOROFORM'

'Venous blood'

TAZa = (KXa*CVXa)+(QC*CVa)-(QC*CVZa) ! Acc. rate ven. blood
 (mg/hr)
 AZa = INTEG(TAZa,0.) ! Quantity ven. blood (mg)
 CVZa = AZa/VVZ ! Conc. in venous blood
 (mg/L)
 CVa = (QF*CVFa+QG*CVGa+QR*CVRa+QMP*CVMPa+QE*CVEa)/QC ! Conc.
 mCVa = (CVa/PMa)*1000 ! Conc. (umole/L)

'Lung'

CAZa = (QC*CVZa+QALV*CIa)/(QC+(QALV/prba)) ! Conc. art. (mg/L)
 CEXPa = CAZa/prba ! Conc. exp air (mg/L)

'Arterial blood'

TAYa = QC*(CAZa-CAa) ! Acc. rate art. blood
 (mg/hr)
 AYa = INTEG(TAYa,0) ! Quantity art. blood (mg)
 CAa = AYa/VVY ! Conc. arterial blood (mg/L)

'BROMODICHLOROMETHANE'

'Venous blood'

TAZb = (KXb*CVXb)+(QC*CVb)-(QC*CVZb) ! Acc. rate ven. blood
(mg/hr)

AZb = INTEG(TAZb,0.) ! Quantity ven. blood (mg)

CVZb = AZb/VVZ ! Conc. in venous blood

(mg/L)

CVb = (QF*CVFb+QG*CVGb+QR*CVRb+QMP*CVMPb+QE*CVEb)/QC ! Conc.

mCVb = (CVb/PMb)*1000 ! Conc. (umole/L)

'Lung'

CAZb = (QC*CVZb+QALV*CIb)/(QC+(QALV/prbb)) ! Conc. art. (mg/L)

CEXPb = CAZb/prbb ! Conc. exp air (mg/L)

'Arterial blood'

TAYb = QC*(CAZb-CAb) ! Acc. rate art. blood
(mg/hr)

AYb = INTEG(TAYb,0) ! Quantity art. blood (mg)

CAb = AYb/VVY ! Conc. arterial blood (mg/L)

'DIBROMOCHLOROMETHANE'

'Venous blood'

TAZc = (KXc*CVXc)+(QC*CVc)-(QC*CVZc) ! Acc. rate ven. blood
(mg/hr)

AZc = INTEG(TAZc,0.) ! Quantity ven. blood (mg)

CVZc = AZc/VVZ ! Conc. in venous blood

(mg/L)

CVc = (QF*CVFc+QG*CVGc+QR*CVRc+QMP*CVMPc+QE*CVEc)/QC ! Conc.

mCVc = (CVc/PMc)*1000 ! Conc. (umole/L)

'Lung'

CAZb = (QC*CVZb+QALV*CIb)/(QC+(QALV/prbb)) ! Conc. art. (mg/L)

CEXPb = CAZb/prbb ! Conc. expired air

(mg/L)

'Arterial blood'

TAYb = QC*(CAZb-CAb) ! Acc. rate art. blood
(mg/hr)

AYb = INTEG(TAYb,0) ! Quantity art. blood (mg)

CAb = AYb/VVY ! Conc. arterial blood (mg/L)

'BROMOFORM'

'Venous blood'

TAZd = (KXd*CVXd)+(QC*CVd)-(QC*CVZd) ! Acc. rate ven. blood
(mg/hr)

AZd = INTEG(TAZd,0.) ! Quantity ven. blood (mg)

CVZd = AZd/VVZ ! Conc. in venous blood

(mg/L)

CVd = (QF*CVFd+QG*CVGd+QR*CVRd+QMP*CVMPd+QE*CVEd)/QC ! Conc.

mCVd = (CVd/PMd)*1000 ! Conc. (umole/L)

'Lung'

CAZd = (QC*CVZb+QALV*CIb)/(QC+(QALV/prbd)) ! Conc. art. (mg/L)

CEXPd = CAZb/prbd ! Conc. expired air

(mg/L)


```

'Arterial blood'
TAYd = QC*(CAZd-CAd)           ! Acc. rate art. blood
(mg/hr)
AYd = INTEG(TAYd,0)           ! Quantity art. blood (mg)
CAD = AYd/VVY                 ! Conc. arterial blood (mg/L)

```

PROCEDURAL

```

(TMETa, TMETb, TMETc, TMETd=TMETA0, TMETA1, TMETA2, TMETA3, ...
TMETb0, TMETb1, TMETb2, TMETb3, TMETc0, TMETc1, TMETc2, TMETc3, ...
TMETd0, TMETd1, TMETd2, TMETd3)

```

'Type of metabolic interaction'

```

IF (INTER.EQ.0) GO TO MET0
IF (INTER.EQ.1) GO TO MET1
IF (INTER.EQ.2) GO TO MET2
GO TO MET3

```

MET0..CONTINUE

```

  TMETA = TMETA0
  META = META0
  TMETb = TMETb0
  METb = METb0
  TMETc = TMETc0
  METc = METc0
  TMETd = TMETd0
  METd = METd0
  GO TO SUITE

```

MET1..CONTINUE

```

  TMETA = TMETA1
  META = META1
  TMETb = TMETb1
  METb = METb1
  TMETc = TMETc1
  METc = METc1
  TMETd = TMETd1
  METd = METd1
  GO TO SUITE

```

MET2..CONTINUE

```

  TMETA = TMETA2
  META = META2
  TMETb = TMETb2
  METb = METb2
  TMETc = TMETc2
  METc = METc2
  TMETd = TMETd2
  METd = METd2
  GO TO SUITE

```

MET3..CONTINUE

```

  TMETA = TMETA3
  META = META3
  TMETb = TMETb3
  METb = METb3

```

```

    TMETc = TMETc3
    METc = METc3
    TMETd = TMETd3
    METd = METd3
SUITE.. CONTINUE
END

'Compound in liver'

'CHLOROFORM'
    TAFa = (QF*CAa)-(QF*CVFa)-TMETa      ! Acc. rate in liver (mg/hr)
    Afa = INTEG(TAFa,0)                  ! Quantity in liver (mg)
    CFa = Afa/VF                          ! Conc. in liver (mg/L)
    CVFa = CFa/prfa                       ! Venous conc. in liver (mg/L)

'BROMODICHLOROMETHANE'
    TAFb = (QF*CAb)-(QF*CVFb)-TMETb      ! Acc. rate in liver (mg/hr)
    AFb = INTEG(TAFb,0)                  ! Quantity in liver (mg)
    CFb = AFb/VF                          ! Conc. in liver (mg/L)
    CVFb = CFb/prfb                       ! Venous conc. in liver (mg/L)

'DIBROMOCHLOROMETHANE'
    TAFc = (QF*CAc)-(QF*CVFc)-TMETc      ! Acc. rate in liver (mg/hr)
    AFc = INTEG(TAFc,0)                  ! Quantity in liver (mg)
    CFc = AFc/VF                          ! Conc. in liver (mg/L)
    CVFc = CFc/prfc                       ! Venous conc. in liver (mg/L)

'BROMOFORM'
    TAFd = (QF*CA d)-(QF*CVFd)-TMETd     ! Acc. rate in liver (mg/hr)
    Afd = INTEG(TAFd,0)                  ! Quantity in liver (mg)
    CFd = Afd/VF                          ! Conc. in liver (mg/L)
    CVFd = CFd/prfd                       ! Venous conc. in liver (mg/L)

'Compound in kidney'

'CHLOROFORM'
    TAEa = (QE*CAa)-(QE*CVEa)-TMa        ! Acc. rate in kidney (mg/hr)
    AEa = INTEG(TAEa,0)                  ! Quantity in kidney (mg)
    CEa = AEa/VE                          ! Conc. in kidney (mg/L)
    CVEa = CEa/prea                       ! Venous conc. in kidney (mg/L)

'BROMODICHLOROMETHANE'
    TAEb = (QE*CAb)-(QE*CVEb)-TMb        ! Acc. rate in kidney (mg/hr)
    AEb = INTEG(TAEb,0)                  ! Quantity in kidney (mg)
    CEb = AEb/VE                          ! Conc. in kidney (mg/L)
    CVEb = CEb/preb                       ! Venous conc. in kidney (mg/L)

'DIBROMOCHLOROMETHANE'
    TAEc = (QE*CAc)-(QE*CVEc)-TMc        ! Acc. rate in kidney (mg/hr)
    AEc = INTEG(TAEc,0)                  ! Quantity in kidney (mg)
    CEc = AEc/VE                          ! Conc. in kidney (mg/L)
    CVEc = CEc/preb                       ! Venous conc. in kidney (mg/L)

'BROMOFORM'
    TAE d = (QE*CA d)-(QE*CVED)-TMd       ! Acc. rate in kidney (mg/hr)
    AEd = INTEG(TAE d,0)                 ! Quantity in kidney (mg)
    CED = AEd/VE                          ! Conc. in kidney (mg/L)

```


'Compound in poorly perfused tissues'

'CHLOROFORM'

TAMPa = QMP*(CAa-CVMPa) ! Acc. rate in ppt (mg/hr)
 AMPa = INTEG(TAMPa,0) ! Quantity in ppt (mg)
 CMPa = AMPa/VMP ! Conc. in ppt (mg/L)
 CVMPa = CMPa/prmpa ! Venous conc. in ppt (mg/L)

'BROMODICHLOROMETHANE'

TAMPb = QMP*(CAb-CVMPb) ! Acc. rate in ppt (mg/hr)
 AMPb = INTEG(TAMPb,0) ! Quantity in ppt (mg)
 CMPb = AMPb/VMP ! Conc. in ppt (mg/L)
 CVMPb = CMPb/prmpb ! Venous conc. in ppt (mg/L)

'DIBROMOCHLOROMETHANE'

TAMPc = QMP*(CAc-CVMPc) ! Acc. rate in ppt (mg/hr)
 AMPc = INTEG(TAMPc,0) ! Quantity in ppt (mg)
 CMPc = AMPc/VMP ! Conc. in ppt (mg/L)
 CVMPc = CMPc/prmpc ! Venous conc. in ppt (mg/L)

'BROMOFORM'

TAMPd = QMP*(CAd-CVMPd) ! Acc. rate in ppt (mg/hr)
 AMPd = INTEG(TAMPd,0) ! Quantity in ppt (mg)
 CMPd = AMPd/VMP ! Conc. in ppt (mg/L)
 CVMPd = CMPd/prmpd ! Venous conc. in ppt (mg/L)

'Metabolism in kidney'

TMa = VMEa*CVEa/(KMa+CVEa) ! Metabolic rate (mg/hr) CHCl3
 Ma = INTEG(TMa,0.) ! Qty metabolites (mg) CHCl3

TMb = VMEb*CVEb/(KMb+CVEb) ! Metabolic rate (mg/hr) BDCM
 Mb = INTEG(TMb,0.) ! Qty metabolites (mg) BDCM

TMc = VMEc*CVEc/(KMc+CVEc) ! Metabolic rate (mg/hr) DBCM
 Mc = INTEG(TMc,0.) ! Qty metabolites (mg) DBCM

TMd = VMEd*CVEd/(KMd+CVEd) ! Metabolic rate (mg/hr) TBM
 Md = INTEG(TMd,0.) ! Qty metabolites (mg) TBM

'Metabolism in liver - CHCl3'

'no interaction'

TMETA0 = VMAXa*CVFa/(KMa+CVFa)
 META0 = INTEG(TMETA0,0.)

'competitive inhibition'

TMETA1 = VMAXa*CVFa/(KMa*(1+CVFb/Kiba+CVFc/Kica+CVFd/Kida)+CVFa)
 META1 = INTEG(TMETA1,0.)

'non-competitive inhibition'

TMETA2 = VMAXa*CVFa/((KMa+CVFa)*(1+(CVFb/Kiba+CVFc/Kica+CVFd/Kida)))
 META2 = INTEG(TMETA2,0.)

'incompetitive inhibition'

TMETA3 = VMAXa*CVFa/(KMa+(CVFa*(1+(CVFb/Kiba+CVFc/Kica+CVFd/Kida))))
 META3 = INTEG(TMETA3,0.)

```

'Metabolism in liver - BDCM'
  'no interaction'
TMETb0 = VMAXb*CVFb/(KMb+CVFb)
METb0 = INTEG(TMETb0,0.)
  'competitive inhibition'
TMETb1 = VMAXb*CVFb/(KMb*(1+CVFa/Kiab+CVFc/Kicb+CVFd/Kidb)+CVFb)
METb1 = INTEG(TMETb1,0.)
  'non-competitive inhibition'
TMETb2 = VMAXb*CVFb/((KMb+CVFb)*(1+(CVFa/Kiab+CVFc/Kicb+CVFd/Kidb)))
METb2 = INTEG(TMETb2,0.)
  'incompetitive inhibition'
TMETb3 = VMAXb*CVFb/(KMb+(CVFb*(1+(CVFa/Kiab+CVFc/Kicb+CVFd/Kidb))))
METb3 = INTEG(TMETb3,0.)

'Metabolism in liver - DBCM'
  'no interaction'
TMETc0 = VMAXc*CVFc/(KMc+CVFc)
METc0 = INTEG(TMETc0,0.)
  'competitive inhibition'
TMETc1 = VMAXc*CVFc/(KMc*(1+CVFa/Kiac+CVFb/Kibc+CVFd/Kidc)+CVFc)
METc1 = INTEG(TMETc1,0.)
  'non-competitive inhibition'
TMETc2 = VMAXc*CVFc/((KMc+CVFc)*(1+(CVFa/Kiac+CVFb/Kibc+CVFd/Kidc)))
METc2 = INTEG(TMETc2,0.)
  'incompetitive inhibition'
TMETc3 = VMAXc*CVFc/(KMc+(CVFc*(1+(CVFa/Kiac+CVFb/Kibc+CVFd/Kidc))))
METc3 = INTEG(TMETc3,0.)

'Metabolism in liver - TBM'
  'no interaction'
TMETd0 = VMAXd*CVFd/(KMd+CVFd)
METd0 = INTEG(TMETd0,0.)
  'competitive inhibition'
TMETd1 = VMAXd*CVFd/(KMd*(1+CVFa/Kiad+CVFb/Kibd+CVFc/Kicd)+CVFd)
METd1 = INTEG(TMETd1,0.)
  'non-competitive inhibition'
TMETd2 = VMAXd*CVFd/((KMd+CVFd)*(1+(CVFa/Kiad+CVFb/Kibd+CVFc/Kicd)))
METd2 = INTEG(TMETd2,0.)
  'incompetitive inhibition'
TMETd3 = VMAXd*CVFd/(KMd+(CVFd*(1+(CVFa/Kiad+CVFb/Kibd+CVFc/Kicd))))
METd3 = INTEG(TMETd3,0.)

'Mass balance of animal'

'CHLOROFORM'
TACCa = QALV*(CIa-CEXPa)           ! Acc. rate in animal (mg/hr)
ACCa = INTEG(TACCa,0)             ! Quantity in animal (mg)
EXEa = -ACCa                       ! Quantity expired air - IV (mg)
DOSEa = (IVDOSa*BW*PMa)+ ACCa      ! Orale dose + inhalation
MASSa = AZa+AYa+ARa+AGa+AMPa+AFa+AEa+AXa+METa+Ma
BILANa = DOSEa-MASSa              ! Balance must equal zero

```

```

'BROMODICHLOROMETHANE'
TACCb = QALV*(CIb-CEXPb)           ! Acc. rate in animal (mg/hr)
ACCb = INTEG(TACCb,0)              ! Quantity in animal (mg)
EXEb = -ACCb                       ! Quantity expired air - IV (mg)
DOSEb = (IVDOSb*BW*PMb)+ ACCb      ! Orale dose + inhalation
MASSb = AZb+AYb+ARb+AGb+AMPb+AFb+AEB+AXb+METb+Mb
BILANb = DOSEb-MASSb               ! Balance must equal zero

'DIBROMOCHLOROMETHANE'
TACCc = QALV*(CIc-CEXPc)           ! Acc. rate in animal (mg/hr)
ACCc = INTEG(TACCc,0)              ! Quantity in animal (mg)
EXEc = -ACCc                       ! Quantity expired air - IV (mg)
DOSEc = (IVDOSc*BW*PMc)+ ACCc      ! Orale dose + inhalation
MASSc = AZc+AYc+ARc+AGc+AMPc+AFc+AEC+AXc+METc+Mb
BILANc = DOSEc-MASSc               ! Balance must equal zero

'BROMOFORM'
TACCd = QALV*(CId-CEXPd)           ! Acc. rate in animal (mg/hr)
ACCd = INTEG(TACCd,0)              ! Quantity in animal (mg)
EXEd = -ACCd                       ! Quantity expired air - IV (mg)
DOSEd = (IVDOSd*BW*PMd)+ ACCd      ! Orale dose + inhalation
MASSd = AZd+AYd+ARd+AGd+AMPd+AFd+AED+AXd+METd+Md
BILANd = DOSEd-MASSd               ! Balance must equal zero

TERMT(T.GE.TSTOP)                  $ 'End of SIMULATION'

END                                 $ 'END of DERIVATIVE section'
END                                 $ 'END of DYNAMIC section'
END                                 $ 'END of PROGRAM'

```

CHAPITRE SIX

DISCUSSION GÉNÉRALE

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

La population est continuellement exposée à des mélanges complexes de substances chimiques présentes dans son environnement. Les trihalométhanes et les acides chloroacétiques sont des sous-produits formés suite à la désinfection de l'eau par le chlore. Leur présence commune dans l'eau de consommation suggère la possibilité que leurs composantes interagissent entre elles modifiant ainsi leur toxicité. Ce projet de recherche a permis de confirmer qu'effectivement, les acides chloroacétiques influencent la cinétique des trihalométhanes *in vivo* (Article 1) mais non l'inverse (Article 2). Plus précisément, on a démontré que, à doses élevées (0,125 mmol/kg), le TCA augmente la concentration veineuse du chloroforme, du BDCM, du DBCM et du TBM lorsque administrés par la voie intra-veineuse. À dose similaire, le DCA entraîne une augmentation des concentrations sanguines de DBCM et de TBM tandis que le MCA cause une augmentation des concentrations de BDCM et de DBCM. Lorsque des mélanges plus complexes ont été administrés aux rats, on a remarqué que les THM avait pour effet de modifier leur propre cinétique (inhibition réciproque). Un mélange quaternaire contenant une dose de 0,03125 mmol/kg de chacun des THM a causé une diminution de la clairance sanguine des quatre THM. Cet effet a été davantage amplifié lorsqu'une dose de 0,125 mmol/kg de TCA a été ajouté au mélange contenant les quatre THM. En revanche, le DCA n'a pas produit cet effet.

L'administration de mélanges complexes a permis de confirmer que les THM interagissent entre eux à doses élevées. Des résultats similaires avaient déjà été observés suite à l'administration orale d'une dose de 1 mmol/kg d'un mélange quaternaire de THM (Da Silva *et al.*, 1999). La comparaison de la cinétique de chacun des THM obtenue à la dose de 0,03125 mmol/kg avec celle obtenue à la dose de 0,125 mmol/kg a montré que le métabolisme des THM était probablement saturé à la dose la plus élevée.

La surface sous la courbe (SSC) ainsi que la concentration maximale (C_{max}) ont été évaluées pour chacun des scénarios d'exposition. Dans le cas des THM bromés, on a remarqué que la C_{max} apparaissait après environ vingt minutes. Ce délai a été attribué au véhicule utilisé, l'Alkamuls[®], lors de l'administration intra-veineuse. Pour cette raison, la SSC est probablement un meilleur indicateur de l'interférence toxicocinétique et du risque en ce qui a trait à l'exposition aux THM.

Les THM, en revanche, ne modifient pas la cinétique du TCA et du DCA. On a également observé que, suite à l'administration d'une dose similaire (0,125 mmol/kg), on retrouve beaucoup plus d'acides chloroacétiques dans le sang que de THM. Étant donné leur grande volatilité, les THM sont probablement exhalés rapidement suite à l'administration intra-veineuse. De plus, en raison de leur grande affinité pour le gras, les THM sont rapidement entreposés dans ce tissu. Dans tous les scénarios d'exposition, les THM ont été éliminés du sang en moins de 6 heures. Pour sa part, le TCA a persisté plus de 40 heures dans le sang des animaux en raison de sa forte liaison aux protéines plasmatiques. Quant au DCA, il a été éliminé du sang en moins de 3 heures probablement en raison de son métabolisme très élevé.

Les études *in vitro* ont démontré que le TCA a pour effet d'inhiber le métabolisme des quatre THM (Article 3). Cependant, le DCA et le MCA n'ont eu aucune influence sur la cinétique *in vitro* des THM. Il est connu que le TCA est métabolisé au niveau des microsomes par le cytochrome P450 (Ni *et al.*, 1996) tandis que le DCA est principalement métabolisé au niveau du cytosol (Lipscomb *et al.*, 1995). Pour ce qui est du MCA, Davis et Berndt (1992) ont également observé qu'il avait peu d'effet sur le métabolisme du chloroforme. Le MCA se conjugue surtout avec le glutathion (Yllner, 1971).

L'analyse de la cinétique enzymatique basée sur l'approche Lineweaver-Burk a permis d'identifier le mécanisme d'inhibition entre le TCA et les THM. Le TCA inhibe la biotransformation du chloroforme par un mécanisme

compétitif alors que l'inhibition pour le BDCM et le TBM est de type non-compétitif. L'identification du mécanisme pour le TCA et le DBCM a été moins évidente. Puisque le DBCM est structurellement similaire au deux autres THM bromés, on peut penser que le mécanisme est également de type non-compétitif.

Lorsque l'activité microsomale a été mesurée pour un mélange contenant les quatre THM ainsi que différents mélanges binaires de THM, on a remarqué que les THM inhibaient leur propre métabolisme en milieu *in vitro*. Le chloroforme a été le composé le plus inhibé par les trois autres THM tandis que le bromoforme a été le moins inhibé. Les THM sont également des substances métabolisées par le cytochrome P450 (Anders *et al.*, 1978; Stevens *et al.*, 1979; Ahmed *et al.*, 1980).

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'isoforme CYP2E1 était l'enzyme responsable du métabolisme des THM (Nakajima *et al.*, 1995; Testai *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 1997b; Pankow *et al.*, 1997; Constan *et al.*, 1999). On a également supposé que cet isoforme jouait un rôle important dans l'interaction entre les acides chloroacétiques et le chloroforme (Davis, 1992). Pour cette raison, des expériences ont ensuite été conduites avec le 4-méthylpyrazole, un puissant inhibiteur compétitif du CYP2E1 (McMartin et Collins; 1988). En milieu *in vitro*, le 4-méthylpyrazole a eu pour effet d'inhiber les quatre THM dans l'ordre suivant : chloroforme > BDCM > DBCM = TBM confirmant ainsi l'implication, du moins partielle, du CYP2E1 dans le métabolisme des THM.

L'ensemble de ces résultats ont fourni des informations importantes pour le développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique (TCBP) pour les THM seuls et en mélanges (Article 4). Un modèle TCBP a premièrement été développé pour chacun des THM administrés par voie intra-veineuse. Ces quatre modèles ont été basés sur les modèles initialement développés par Da Silva et collaborateurs (1999). Un compartiment « véhicule » décrivant le relachement des THM dans le sang

veineux a toutefois été incorporé en tenant compte des coefficients de partage Alkamuls[®]:sang pour les quatre THM. Les modèles individuels ont permis de déterminer la constante d'ordre zero pour chacun des THM lorsqu'ils sont administrés par voie intra-veineuse dans l'Alkamuls[®].

Le modèle TCBP pour le mélange quaternaire a été construit en reliant les quatre modèles individuels via un terme décrivant l'interaction entre les THM au niveau du compartiment hépatique. L'inhibition compétitive a le mieux décrit l'interaction observée entre les THM durant les expériences *in vivo*. L'interaction entre le TCA et les THM a pu être simulée en modifiant le métabolisme des THM dans les modèles individuels. L'inhibition compétitive du chloroforme par le TCA, observée au cours des études *in vivo*, a pu être décrite en augmentant la constante d'affinité (K_m) du chloroforme. Pour les trois THM bromés, une réduction de la vitesse maximale (V_{max}) a permis de décrire l'inhibition non-compétitive engendrée par le TCA.

La caractérisation des interactions entre les composantes d'un mélange en milieu *in vivo* est un processus coûteux qui prend généralement beaucoup de temps. La modélisation TCBP des THM en mélange à l'avantage d'être une méthode simple et rapide permettant la simulation de divers scénarios d'exposition tout en considérant les interactions entre les THM. Ainsi, le modèle développé pour un rat exposé à une concentration élevée de THM peut facilement être extrapolé vers l'humain exposé à une concentration plus faible pouvant être retrouvée dans l'environnement. La modélisation TCBP des mélanges s'avère ainsi un outil efficace dans un contexte d'évaluation du risque puisqu'elle permet i) de considérer les interactions entre les composantes du mélange et ii) de considérer la variation interindividuelle dans la population exposée puisqu'elle décrit la concentration tissulaire. Un exemple est présenté dans les lignes qui suivent.

Analyse des risques associés aux THM seuls et sous forme de mélange: approche basée sur la concentration tissulaire.

L'analyse de risque à la santé associée à l'exposition aux THM est le processus par lequel on estime la probabilité d'altérations de la santé attribuables aux THM.

Afin d'analyser le risque de l'exposition aux THM chez l'humain, les modèles TCBP des quatre THM développés chez le rat ont été extrapolés afin de décrire l'humain. Pour chacun des modèles, les paramètres physiologiques et le coefficient de partage sang:air du rat ont été remplacés par ceux de l'humain tandis que la vitesse maximale (V_{max}) a été ajustée au poids corporel^{2/3}. Les constantes d'inhibition, la constante d'affinité Michaëlis-Menten (K_m) et les coefficients de partage tissu:sang sont demeurés les mêmes puisqu'ils sont considérés invariables entre les espèces. Dans le cas du chloroforme, le V_{max} , le K_m et les coefficients de partage ont été modifiés selon les valeurs spécifiées par Corley et collaborateurs (1990). Pour le mélange des THMs, les quatre modèles individuels ont été interconnectés via un terme décrivant l'inhibition métabolique compétitive.

Afin d'évaluer le risque d'altérations de la santé suite à l'ingestion d'eau contenant un mélange de THM, un scénario d'exposition a été testé. Les concentrations de THM utilisées correspondaient aux concentrations maximales acceptables (CMA) établies par l'Organisation Mondiale de la Santé. Une consommation d'eau de 2,4 L/jour a été supposée, correspondant au 85^e percentile de la valeur déterminée lors d'un sondage québécois (Levallois *et al.*, 1998). Par exemple, la dose d'exposition (D) utilisée pour le dibromochlorométhane et le bromoforme était de :

$$D = \frac{CMA \times VI}{PC} = \frac{100 \mu\text{g/L} \times 2,4 \text{ L/jour}}{70 \text{ kg}} = 3,43 \mu\text{g/kg/jour}$$

où, CMA est la concentration maximale acceptable, VI est le volume ingéré et PC est le poids corporel.

La dose d'exposition (D) pour le bromodichlorométhane était de 2,06 µg/kg/jour et de 6,86 µg/kg/jour pour le chloroforme.

Les modèles TCBP des THM individuels ont premièrement été utilisés afin de simuler l'exposition à chacun des THM par voie orale. Le modèle TCBP du mélange a ensuite permis de simuler l'exposition aux quatre THM. Dans chacun des scénarios, on a déterminé la surface sous la courbe et la quantité métabolisée dans l'organe cible suite à une exposition de 24 heures (Tableau 1). Lorsque la toxicité est associée à la substance mère, la surface sous la courbe (SSC) dans l'organe cible est une bonne représentation de l'exposition tissulaire. Cependant, lorsque la toxicité est associée aux métabolites, il est préférable d'utiliser, par exemple, la quantité métabolisée (Qmet). Afin d'éviter toute confusion possible, on parlera dorénavant d'exposition tissulaire au lieu de concentration tissulaire mais l'approche demeure la même.

Tableau 1. Surface sous la courbe et quantité métabolisée dans l'organe cible pour les quatre THM, seuls et en mélange, lors d'une exposition aux concentrations maximales acceptables de l'OMS.

THM	Organe cible	Surface sous la courbe (µg/L*h)		Quantité métabolisée (µg)	
		Seul	Mélange	Seul	Mélange
Chloroforme	Rein	0,000401	0,000401	0,002355	0,002355
BDCM	Rein	0,000220	0,000220	0,000813	0,000813
DBCM	Foie	0,001037	0,001037	0,150675	0,150675
TBM	Foie	0,000674	0,000674	0,160002	0,160002

On remarque qu'aux concentrations maximales acceptables (CMA), le modèle TCBP du mélange de THM donne les mêmes résultats que les modèles des quatre THM individuels. On peut en conclure qu'aux concentrations retrouvées dans l'eau de consommation, les THM n'interagissent pas entre eux et leur réponse est additive. L'inhibition compétitive entre les THM a été observée lors d'études toxicologiques où la dose des composés était élevée. Malgré le changement théorique que peut engendrer un inhibiteur sur la biotransformation d'un substrat, et ce, quel

que soit la dose d'exposition, un tel effet sur la cinétique du substrat ne sera pas toujours biologiquement significatif, voire démontrable, à doses faibles (Dobrev *et al.*, 2001) en raison de l'existence probable d'un seuil d'interaction et d'une limite à détecter les changements.

1) Les effets cancérigènes

L'Agence de Protection Environnementale des États-Unis a établi un risque unitaire (q^*) pour les trois trihalométhanes bromés présents dans l'eau de consommation (USEPA, 2002b, c, d). Les valeurs de risque unitaire (q^*) pour le bromodichlorométhane, le dibromochlorométhane et le bromoforme sont respectivement de $1,8 \times 10^{-6} (\mu\text{g/L})^{-1}$, $2,4 \times 10^{-6} (\mu\text{g/L})^{-1}$ et $2,3 \times 10^{-7} (\mu\text{g/L})^{-1}$. Le risque unitaire réfère à l'augmentation de la probabilité de développer un cancer lorsque la concentration du THM augmente de $1 \mu\text{g/L}$, et correspond à la pente de la courbe dose-réponse. L'utilisation du risque unitaire (q^*) repose sur l'hypothèse que le mécanisme de l'action cancérigène n'implique pas de seuil et que la réponse est linéaire. Contrairement aux trihalométhanes bromés, le chloroforme entraîne la formation de tumeurs cancérigènes à fortes doses seulement. Comme la majorité des études concluent que le chloroforme est un composé non-génotoxique et que son mécanisme de cancérigénicité peut-être décrit par une courbe dose-réponse impliquant l'existence d'un seuil, la notion de risque unitaire ne s'applique pas pour ce composé.

Étant donné que le risque unitaire pour les trois trihalométhanes bromés a été établi en fonction d'une exposition orale chez des rongeurs, des modèles TCBP développés chez l'animal pour cette même route (Da Silva *et al.*, 1999) ont été utilisés afin de déterminer le potentiel cancérigène basé sur l'exposition tissulaire (q^*_{ti}). Chaque modèle a été utilisé afin de décrire l'exposition chez un rat à une concentration orale de $1 \mu\text{g/L}$ de THM pour une période de 24 heures. Une consommation d'eau de 10 mL/jour a été supposée pour un rat de 250 g . Le potentiel cancérigène basé sur

l'exposition tissulaire (q^*_{ti}) a ensuite été déterminé à l'aides des équations 4 et 6 présentées en introduction (section 1.6.1):

$$P(CT) = P(C)$$

et donc :

$$q^*_{ti} = \frac{q^*_i \times C_i}{CT_i}$$

où, q^*_i est le risque unitaire établi par l'agence de protection environnementale des États-Unis pour un THMi donné, C_i est la concentration d'exposition du THMi (1 $\mu\text{g/L}$) et CT_i représente l'exposition tissulaire du THMi.

Le tableau 2 présente les q^*_{ti} des trois trihalométhanes bromés déterminés en utilisant la quantité métabolisée (Q_{met}) et la surface sous la courbe (SSC), et ce, pour l'organe cible identifié pour chacun des THM.

Tableau 2. Le potentiel cancérrogène des trois trihalométhanes bromés basé sur deux différentes mesures (SSC et Q_{met}) de l'exposition tissulaire (q^*_{ti}).

THM	Organe cible	q^*_{SSC} ($\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$) ⁻¹	$q^*_{Q_{\text{met}}}$ (μg) ⁻¹
BDCM	Rein	0,002381	0,017476
DBCM	Foie	0,001589	0,000233
TBM	Foie	0,000204	0,000022

Dans le cas du TBM, le foie a été considéré l'organe cible puisque le côlon n'est pas un compartiment identifié dans le modèle TCBP utilisé.

Les modèles TCBP du rat ont permis de déterminer le potentiel cancérrogène basé sur l'exposition tissulaire (q^*_{ti}) pour chacun des trois THM. On remarque que le potentiel cancérrogène augmente dans l'ordre suivant : TBM < DBCM < BDCM peu importe la mesure de l'exposition tissulaire utilisée (SSC ou Q_{met}).

Afin de déterminer le risque cancérigène associé à l'exposition aux THM bromés chez l'humain, on a multiplié le potentiel cancérigène (q^*_{ti}) avec la mesure de l'exposition tissulaire (SSC ou Q_{met}) chez l'humain décrite dans le tableau 1 et extrapolée à l'aide du modèle TCBP.

Le tableau 3 présente les risques cancérigènes associés à l'exposition d'un mélange de THM bromés dans l'eau de consommation lorsque l'exposition tissulaire est considérée et en supposant que le potentiel cancérigène des composés est invariable entre le rat et l'humain. L'approche conventionnelle qui est également présentée à titre de comparaison, considère toutefois que la concentration d'exposition.

Tableau 3. Niveau de risque (R) pour un mélange de THM bromés estimé selon l'approche conventionnelle et la nouvelle approche basée sur l'exposition tissulaire.

THM	Concentration d'exposition ¹ ($\mu\text{g/L}$)	Approche conventionnelle	Nouvelle approche	
		P(c)	P(c _{ssc})	P(c _{Amet})
BDCM	60	$1,08 \times 10^{-4}$	$5,23 \times 10^{-7}$	$1,42 \times 10^{-5}$
DBCM	100	$2,40 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-6}$	$3,51 \times 10^{-5}$
TBM	100	$2,30 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-7}$	$3,52 \times 10^{-6}$
$\Sigma P(d)$	-	$3,71 \times 10^{-4}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$5,28 \times 10^{-5}$

1) Concentration maximale acceptable établie par l'OMS

Le risque généralement acceptable, pour une exposition à une ou plusieurs substances chimiques, correspond à un cancer sur un million, ou moins. A l'aide de l'approche conventionnelle, on a estimé, dans cette étude, que 4 personnes sur 10 000 risquent de développer un cancer suite à l'exposition à un mélange contenant les concentrations maximales (présentées au Tableau 3) de THM bromés. Lorsque la quantité métabolisée (Q_{met}) a été utilisée comme mesure de l'exposition aux THM bromés, le risque de développer un cancer a diminué, pour se situer à 5 personnes sur 100 000. Ce risque a davantage diminué lorsque la toxicité était associée aux THM sous leur forme inchangée (SSC); deux personnes sur 1 000 000 étaient considérées à risque de développer un cancer. Par comparaison, et en tenant compte de l'exposition orale, dermale et par inhalation, Maxwell et

collaborateurs (1991) ont calculé qu'entre 2 et 4 personnes sur 10 000 sont susceptibles de développer un cancer suite à l'exposition quotidienne à 100 µg/L de THM totaux dans l'eau potable. De leur côté, Lee et collaborateurs (2004) ont calculé que, dans la ville de Hong Kong, 8 personnes sur 100 000 risquent de développer le cancer suite à l'exposition aux trihalométhanes par la voie orale. Ils ont également établi que le BDCM contribuait à 59% du risque, suivi du chloroforme (24%) et du DBCM (17%).

Ainsi, l'approche basée sur la concentration tissulaire indique clairement que le risque de développer un cancer suite à l'exposition aux THM bromés par la voie orale est plus élevé que le risque considéré acceptable. Cependant, étant donné l'absence d'interaction dans le cas présent, l'approche conventionnelle demeure toutefois la plus conservatrice si on la considère lors de l'établissement de normes environnementales. L'approche conventionnelle établit qu'un plus grand nombre de personnes sont à risque suite à une exposition aux THM que l'approche basée sur la concentration tissulaire ce qui pourrait avoir pour d'entraîner une norme environnementale plus sévère afin de protéger le plus grand nombre d'individus possible dans la population.

2) Les effets non-cancérogènes

L'Agence de Protection Environnementale des États-Unis a établi une dose de référence (RfD) pour chacun des quatre trihalométhanes. Cette dose suppose l'existence d'un seuil pour ce qui est des effets toxiques comme la nécrose cellulaire. La dose de référence pour le chloroforme est de 10 µg/kg/jour et de 20 µg/kg/jour pour chacun des trihalométhanes bromés.

Afin d'établir l'indice biologique de danger pour un mélange de THM, la concentration tissulaire de chaque THM, correspondant à une exposition à la dose de référence (RfD), jugée sécuritaire, a été déterminée à l'aide des

modèles TCBP chez l'humain. L'exposition aux THM, seuls et en mélange, administrés par voie orale à la dose de référence a été simulée pour une période de 24 heures. La surface sous la courbe des concentrations sanguines dans l'organe cible a été utilisée comme indice de l'exposition tissulaire (Tableau 4). Pour des expositions correspondant aux doses de référence, le modèle TCBP du mélange des THM prédit des valeurs identiques à celles prédites par les modèles individuels, ce qui montre l'absence d'interaction significative.

Un indice biologique de danger pour chacun des THM a été déterminé en divisant la valeur de la surface sous la courbe obtenue résultant d'une exposition à la CMA par la valeur correspondant à une exposition égale à la RfD. Pour chacun des THM, la concentration maximale acceptable (CMA) de l'OMS correspond à une dose quotidienne inférieure à la dose de référence (RfD) de l'agence de protection environnementale des États-Unis, la valeur des indices biologiques de danger des quatre produits est donc inférieur à l'unité (Tableau 4). Cependant, la somme des indices biologiques de danger des quatre THM est supérieure à l'unité, ce qui signifie que l'exposition à un mélange de THM aux concentrations maximales acceptables entraînerait un risque «inacceptable» pour la santé.

Tableau 4. Surface sous la courbe lors d'une exposition à la dose de référence et indice biologique de danger des THM, seuls et en mélange.

THM	SSC avec RfD ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$)		SSC avec CMA ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$)	Indice Biologique de Danger
	Seul	Mélange	Seul	
Chloroforme	0,000585	0,000585	0,000401	0,60
BDCM	0,007907	0,007907	0,000220	0,10
DBCM	0,006049	0,006049	0,001037	0,17
TBM	0,003960	0,003960	0,000674	0,17
Σ IBD	-	-	-	1,13

En l'absence d'interaction entre les composés d'un mélange, l'indice biologique de danger donne le même résultat que l'indice de danger obtenue par l'approche conventionnelle basée sur l'additivité.

Au Canada, les THM présents dans l'eau potable, se retrouvent à des concentrations nettement inférieures aux concentrations maximales acceptables établies par l'OMS. En effet, on estime que la concentration moyenne annuelle de THM est généralement inférieure à 60 µg/L correspondant à la somme de 50 µg/L de chloroforme, de 10 µg/L de BDCM et de DBCM et de 0,1 µg/L de TBM (Santé Canada, 1993). On peut donc penser que le risque serait moindre que celui estimé plus haut si on utilisait les concentrations réelles, retrouvées dans l'eau de consommation. Dans une étude réalisée dans la ville de Hong Kong, où les concentrations de THM totaux variaient entre 16 et 87 µg/L, on a calculé un indice de danger de 0,34 (Lee *et al.*, 2004). Le modèle TCBP présenté ici ne considère que l'exposition orale. L'intégration des autres sous-produits tels les acides chloroacétiques et des autres voies d'exposition (par exemple, inhalation, peau) dans le modèle TCBP du mélange est souhaitable et permettrait une meilleure estimation du risque à la santé associé aux expositions aux sous-produits de la désinfection retrouvés dans l'eau potable.

Par ailleurs, la nouvelle approche d'analyse de risque basée sur la concentration tissulaire offre, à notre avis, l'avantage de tenir compte de la cinétique des substances dans l'organisme, entre autres, de l'impact potentiel des interactions métaboliques entre les différentes composantes d'un mélange de THM.

L'eau chlorée est un mélange complexe de sous-produits issus de la désinfection. Ce projet de recherche a pour la première fois cherché à caractériser les interactions entre les trihalométhanes et les acides chloroacétiques, les deux plus grandes familles de sous-produits halogénés retrouvés dans l'eau de consommation.

Santé Canada se base actuellement sur la présence unique du chloroforme pour établir la concentration maximale acceptable de 100 µg/L pour la totalité des trihalométhanes retrouvés dans l'eau potable. Aucune norme canadienne ne régit la présence des acides chloroacétiques dans l'eau

potable. Dans cette recherche, il a toutefois été démontré que, à fortes concentrations, le TCA est capable d'inhiber le métabolisme des THM et que ces derniers sont capables d'inhiber leur propre métabolisme lorsqu'ils se retrouvent en mélanges. Cependant, les interactions observées à fortes concentrations ne permettent pas nécessairement de décrire l'ampleur de telles interactions aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Il est possible, qu'aux doses auxquelles l'humain est exposé, les THM et les acides chloroacétiques n'interagissent pas ensemble.

Cette recherche met en évidence l'utilité de la modélisation physiologique dans l'analyse de risque pour les mélanges. Les modèles TCBP développés au cours de cette recherche ont permis de prédire les concentrations de THM dans le sang et les organes cibles lors d'expositions orales à des mélanges de sous-produits de désinfection. L'intégration des différentes voies d'exposition lors de développement de modèles subséquents permettrait de préciser le risque à la santé. De toute évidence, la considération de l'ensemble des sous-produits de la désinfection de l'eau ainsi que la caractérisation des interactions potentielles entre ces diverses substances lors de l'analyse de risque et de l'établissement des normes environnementales est essentielle.

7. BIBLIOGRAPHIE

Abbas R.R., et Fisher J.W. (1997). A physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, chloral hydrate, trichloroacetate, dichloroacetate, trichloroethanol, and trichloroethanol glucuronide in B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **147**, 15-30.

Abdel-Rahman M.S. (1982). The presence of trihalomethane in soft drinks. *Journal of Applied Toxicology* **2**, 165-169.

Aggazzotti G., Fantuzzi G., Tartoni P.L., et Predieri G. (1990). Plasma chloroform concentrations in swimmers using indoor swimming pools. *Archives of Environmental Health* **45**, 175-179.

Ahmed A.E., Kubic V.L., Stevens J.L., et Anders M.W. (1980). Halogenated methanes: metabolism and toxicity. *Federation Proceedings* **39**, 3150-3155.

Aida Y., Takada K., Uchida O., Yasuhara K., Kurokawa Y., et Tobe M. (1992b). Toxicities of microencapsulated tribromomethane, dibromochloromethane and bromodichloromethane administered in the diet to Wistar rats for one month. *Journal of Toxicological Sciences* **17**, 119-133.

Aida Y., Yasuhara K., Takada K., Kurokawa Y., et Tobe M. (1992a). Chronic toxicity of microencapsulated bromodichloromethane administered in the diet to Whistar rats. *Journal of Toxicological Sciences* **17**, 51-68.

Aldrich. (1996). Aldrich. Handbook of fine chemicals. Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee.

Allen B.C., Covington T.R., et Clewell H.J. (1996). Investigation of the impact of pharmacokinetic variability and uncertainty on risks predicted with a pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicology* **111**, 289-303.

Allen B.C., et Fisher J.W. (1993). Pharmacokinetic modeling of trichloroethylene and trichloroacetic acid in humans. *Risk Analysis* **13**, 71-86.

Allis J.W., Anderson B.P., Zhao G., Ross T.M., et Pegram R.A. (2002). Evidence for the involvement of CYP1A2 in the metabolism of bromodichloromethane in rat liver. *Toxicology* **176**, 25-37.

Allis J.W., Brown B.L., Zhao G., et Pegram R.A. (2001). The effects of inhalation exposure to bromo-dichloromethane on specific rat CYP isoenzymes. *Toxicology* **161**, 67-77.

Anders M.W., Stevens J.L., Sprague R.W., Shaath Z., et Ahmed A.E. (1978). Metabolism of haloforms to carbene monoxide. II. *In Vivo* studies. *Drug Metabolism and Disposition* **6**, 556-560.

Andersen M.E., Gargas M.L., Clewell H.J., et Severyn K.M. (1987). Quantitative evaluation of the metabolic interactions between trichloroethylene and 1,1-dichloroethylene in vivo using gas uptake methods. *Toxicology and Applied Pharmacology* **89**, 149-157.

ATSDR. (2001). Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures. Syracuse Research Corporation. pp. 1-61.

Attias L., Contu A., Loizzo A., Massiglia M., Valente P., et Zapponi G.A. (1995). Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans. *The Science of the Total Environment* **171**, 61-68.

Backer L.C., Ashley D.L., Bonin M.A., Cardinali F.L., Kieszak S.M., et Wooten J.V. (2000). Household exposures to drinking water disinfection by-products: whole blood trihalomethane levels. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **10**, 321-326.

Berardi M.K., Snyder R., Waritz R.S., et Cooper K.R. (1987). Monochloroacetic acid toxicity in the mouse associated with blood-brain barrier damage. *Fundamental and Applied Toxicology* **9**, 469-479.

Bhat H.K., Ahmed A.E., et Ansari G.A.S. (1990). Toxicokinetics of monochloroacetic acid: a whole-body autoradiography study. *Toxicology* **63**, 35-43.

Bhat H.K., Kanz M.F., Campbell G.A., et Ansari G.A.S. (1991). Ninety day toxicity study of chloroacetic acids in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* **17**, 240-253.

Boorman G.A., Dellarco V., Dunnick J.K., Chapin R.E., Hunter S., Hauchman F., Gardner H., Cox M., et Sills R.C. (1999). Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspective* **107**, 207-217.

Bove F.J., Fulcomer M.C., Klotz J.B., Esmart J., Dufficy E.M., et Savrin J.E. (1995). Public drinking water contamination and birth outcomes. *American Journal of Epidemiology* **141**, 850-862.

Brown D.M., Langley P.F., Smith D., et Taylor D.C. (1974). Metabolism of chloroform. I. The metabolism of (¹⁴C)chloroform by different species. *Xenobiotica* **4**, 151-163.

Bryant B.J., Jokinen M.P., Eustis S.L., Thompson M.B., et Abdo K.M. (1992). Toxicity of monochloroacetic acid administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice for up to 13 weeks. *Toxicology* **72**, 77-87.

Bull R.J., Brown J.M., Meierhenry E.A., Jorgenson T.A., Robinson G.D., et Stober J.A. (1986). Enhancement of the hepatotoxicity of chloroform in B6C3F1 mice by corn oil: implications for chloroform carcinogenesis. *Environmental Health Perspective* **69**, 49-58.

Bull R.J., Sanchez I.M., Nelson M.A., Larson J.L., et Lansing A.J. (1990). Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology* **63**, 341-359.

Cammann K., et Hübner K. (1995). Trihalomethane concentrations in swimmers' and bath attendants' blood and urine after swimming or working in indoor swimming pools. *Archives of Environmental Health* **50**, 61-65.

Cantor K.P., Hoover R., Hartge P., Mason T.J., Silverman D.T., Altman R., Austin D.F., Child M.A., Key C.R., Marrett L.D., Myers M.H., Narayana A.S., Levin L.I., Sullivan J.W., Swanson G.M., Thomas D.B., et West D.W. (1987). Bladder cancer, drinking water source, and tap water consumption: a case-control study. *Journal of National Cancer Institute* **79**, 1269-1279.

Cantor K.P., Hoover R., Mason T.J., et McCabe L.J. (1978). Associations of cancer mortality with halomethanes in drinking water. *Journal of National Cancer Institute* **61**, 979-985.

Cantor K.P., Lynch C.F., Hildesheim M.E., Dosemeci M., Lubin J., Alavanga M., et Craun G. (1998). Drinking water source and chlorination byproducts. I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology* **9**, 21-28.

Cantor K.P., Lynch C.F., Hildesheim M.E., Dosemeci M., Lubin J., Alavanga M., et Craun G. (1999). Drinking water source and chlorination byproducts in Iowa. III. Risk of brain cancer. *American Journal of Epidemiology* **150**, 552-560.

Carlo G.L., et Mettlin C.J. (1980). Cancer incidence and trihalomethane concentrations in a public drinking water system. *American Journal of Public Health* **70**, 523-525.

Chang L.W., Daniel F.B., et DeAngelo A.B. (1992). Analysis of DNA strand breaks induced in rodent liver in vivo, hepatocytes in primary culture, and a human cell line by chlorinated acetic acids and chlorinated acetaldehydes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **20**, 277-288.

Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M., Diener R.M., et Fisher L.C. (2001a). Oral (drinking water) developmental toxicity studies of bromodichloromethane (BDCM) in rats and rabbits. *International Journal of Toxicology* **20**, 225-237.

Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M., Diener R.M., Fisher L.C., et Gates G.A. (2001b). Biodisposition of dibromoacetic acid (DBA) and bromodichloromethane (BDCM) administered to rats and rabbits in drinking water during range-finding reproduction and developmental toxicity studies. *International Journal of Toxicology* **20**, 239-253.

Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M., Fisher L.C., et Ray Brown W. (2002). Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of bromodichloromethane (BDCM) in rats. *International Journal of Toxicology* **21**, 115-146.

Chu I., Secours V., Marino I., et Villeneuve D.C. (1980). The acute toxicity of four trihalomethanes in male and female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **52**, 351-353.

Chu I., Villeneuve D.C., Secours V.E., et Becking G.C. (1982a). Toxicity of trihalomethanes: I. The acute and subacute toxicity of chloroform, bromodichloromethane, chlorodibromomethane and bromoform in rats. *Journal of Environmental Science and Health* **B17**, 205-224.

Chu I., Villeneuve D.C., Secours V.E., et Becking G.C. (1982b). Trihalomethanes: II. Reversibility of toxicological changes produced by chloroform, bromodichloromethane, chlorodibromomethane and bromoform in rats. *Journal of Environmental Science and Health* **B17**, 225-240.

Clewell H.J., Gentry P.R., Covington T.R., et Gearhart J.M. (2000). Development of a physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment. *Environmental Health Perspective* **108**, 283-305.

Clewell H.J., Gentry P.R., Gearhart J.M., Allen B.C., et Andersen M.E. (1995). Considering pharmacokinetic and mechanistic information in cancer risk assessments for environmental contaminants: examples with vinyl chloride and trichloroethylene. *Chemosphere* **31**, 2561-2578.

Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable. (2002). Résumé des recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. pp. 1-10. Santé Canada. Ottawa.

Condie L.W., Smallwood C.L., et Laurie R.D. (1983). Comparative renal and hepatotoxicity of halomethanes: bromodichloromethane, bromoform, chloroform, dibromochloromethane and methylene chloride. *Drug and Chemical Toxicology* **6**, 563-578.

Constan A.A., Sprankle C.S., Peters J.M., Kedderis G.L., Everitt J.I., Wong B.A., Gonzalez F.L., et Butterworth B.E. (1999). Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **160**, 120-126.

Corley R.A., Gordon S.M., et Wallace L.A. (2000). Physiologically based pharmacokinetic modeling of the temperature-dependant dermal absorption of chloroform by humans following bath exposures. *Toxicological Sciences* **53**, 23.

Corley R.A., Mendrala A.L., Smith F.A., Staats D.A., Gargas M.L., Conolly R.B., Andersen M.E., et Reitz R.H. (1990). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicology and Applied Pharmacology* **103**, 512-527.

Da Silva M.L., Charest-Tardif G., Krishnan K., et Tardif R. (1999). Influence of oral administration of a quaternary mixture of trihalomethanes on their blood kinetics. *Toxicology Letters* **106**, 49-57.

Da Silva M.L., Charest-Tardif G., Krishnan K., et Tardif R. (2000). Evaluation of the pharmacokinetic interactions between orally administered trihalomethanes in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **60**, 343-353.

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

Davis M.E. (1992). Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid increase chloroform toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **37**, 139-148.

Davis M.E., et Berndt W.O. (1992). Sex differences in monochloroacetate pretreatment effects on chloroform toxicity in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* **18**, 66-71.

De Marini D.M., Perry E., et Shelton M.L. (1994). Dichloroacetic and related compounds: induction of prophage in *E. coli* and mutagenicity and mutation spectra in *Salmonella* TA100. *Mutagenesis* **9**, 437.

DeAngelo A.B., Daniel F.B., McMillan L., Wernsing P., et Savage R.E.Jr. (1989). Species and strain sensitivity to the induction of peroxisome proliferation by chloroacetic acids. *Toxicology and Applied Pharmacology* **101**, 285-298.

DeAngelo A.B., Daniel F.B., Most B.M., et Olson G.R. (1996). The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fisher 344 rat. *Toxicology* **114**, 207-221.

DeAngelo A.B., Daniel F.B., Stober J.A., et Olson G.R. (1991). The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundamental and Applied Toxicology* **16**, 337-347.

DeAngelo A.B., George M.H., et House D.E. (1999). Hepatocarcinogenicity in the male B6C3F1 mouse following a lifetime exposure to dichloroacetic acid in the drinking water: dose-response determination and modes of action. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **58**, 485-507.

DeAngelo A.B., Geter D.R., Rosenberg D.W., Crary C.K., et George M.H. (2002). The induction of aberrant crypt foci (ACF) in the colons of rats by trihalomethanes administered in the drinking water. *Cancer Letters* **187**, 25-31.

Delic J.I., Lilly P.D., MacDonald A.J., et Loizou G.D. (2002). The utility of PBPK in the safety assessment of chloroform and carbon tetrachloride. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **32**, 144-155.

DeMarini D.M., Shelton M.L., Warren S.H., Ross T.M., Shim J-Y., Richard A.M., et Pegram R.A. (1997). Glutathione S-transferase-mediated induction of GC - AT transitions by halomethanes in Salmonella. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **30**, 440-447.

Dix K.J., Kedderis G.L., et Borghoff S.J. (1997). Vehicule-dependent oral absorption and target tissue dosimetry of chloroform in male rats and female mice. *Toxicology Letters* **91**, 197-209.

Dobrev I.D., Andersen M.E., et Yang R.S.H. (2001). Assessing interaction thresholds for trichloroethylene in combination with tetrachloroethylene and 1,1,1-trichloroethane using gas uptake studies and PBPK modeling. *Archives of Toxicology* **75**, 134-144.

Dodds L., King W., Woolcott C., et Pole J. (1999). Trihalomethanes in public water supplies and adverse birth outcomes. *Epidemiology* **10**, 233-237.

Doyle T.J., Zheng W., Cerhan J.R., Hong C.-P., Sellers T.A., Kushi L.H., et Folsom A.R. (1997). The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa : a prospective cohort study. *American Journal of Public Health* **87**, 1168-1177.

Dunnick J.K., Eustis S.L., et Lilja H.S. (1987). Bromodichloromethane, a trihalomethane that produces neoplasms in rodents. *Cancer Research* **47**, 5189-5193.

Dunnick J.K., Haseman J.K., Lilja H.S., et Wyand S. (1985). Toxicity and carcinogenicity of chlorodibromomethane in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**, 1128-1136.

Environmental Protection Agency. (1998) Stage 1. Disinfectants and disinfection byproducts rule. Report 815-F-98-010.

Evans M.V., Boyes W.K., Simmons J.E., Litton D.K., et Easterling M.R. (2002). A comparison of Haber's rule at different ages using a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for chloroform in rats. *Toxicology* **176**, 11-23.

Fantuzzi G., Righi E., Predieri G., Ceppelli G., Gobba F., et Aggazzotti G. (2001). Occupational exposure to trihalomethanes in indoor swimming pools. *The Science of the Total Environment* **264**, 257-265.

Fisher J.W., et Allen B.C. (1993). Evaluating the risk of liver cancer in humans exposed to trichloroethylene using physiological models. *Risk Analysis* **13**, 87-95.

Fisher J.W., Gargas M.L., Allen B.C., et Andersen M.E. (1991). Physiologically based pharmacokinetic modeling with trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid, in the rat and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* **109**, 183-195.

Fisher J.W., Mahle D., et Abbas R. (1998). A human physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and free trichloroethanol. *Toxicology and Applied Pharmacology* **152**, 339-359.

Fisher J.W., Whittaker T.A., Taylor D.H., Clewell H.J., et Andersen M.E. (1989). Physiologically based pharmacokinetic modeling of the pregnant rat: a multiroute exposure model for trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **99**, 395-414.

Fisher J.W., Whittaker T.A., Taylor D.H., Clewell H.J., et Andersen M.E. (1990). Physiologically based pharmacokinetic modeling of the lactating rat and nursing pup: a multiroute exposure model for trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* **102**, 497-513.

Freedman D.M., Cantor K.P., Lee N.L., Chen L.-S., Lei H.-H., Ruhl C.E., et Wang S.S. (1997). Bladder cancer and drinking water: a population-based case-control study in Washington County, Maryland (United States). *Cancer Causes and Control* **8**, 738-744.

Froese K.L., Sinclair M.I., et Hrudey S.E. (2002). Trichloroacetic acid as a biomarker of exposure to disinfection by-products in drinking waters: a human exposure trial in Adelaide, Australia. *Environmental Health Perspectives* **110**, 679-687.

Fujie K., Aoki T., et Wada M. (1990). Acute and subacute cytogenetic effects of the trihalomethanes on rat bone marrow cells *in vivo*. *Mutation Research* **242**, 111-119.

Gallagher M.D., Nuckols J.R., Stallones L., et Savitz D.A. (1998). Exposure to trihalomethanes and adverse pregnancy outcomes. *Epidemiology* **9**, 485-489.

Gargas M.L., Burgess R.J., Voisard D.E., Cason G.H., et Andersen M.E. (1989). Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology* **98**, 87-99.

Gennings C., Schwartz P., Carter W.H. Jr., et Simmons J.E. (1997). Detection of departures from additivity in mixtures of many chemicals with a threshold model. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* **2**, 198-211.

George M.H., Olson G.R., Doerfler D., Moore T., Kilburn S., et DeAngelo A.B. (2002). Carcinogenicity of bromodichloromethane administered in drinking water to male F344/N rats and B6C3F1 mice. *International Journal of Toxicology* **21**, 219-230.

Georgopoulos P.G., Roy A., et Gallo M.A. (1994). Reconstruction of short-term multi-route exposure to volatile organic compounds using physiologically based pharmacokinetic models. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **4**, 309-328.

Geter D.R., Chang L.W., Hanley N.M., Ross M.K., Pegram R.A., et DeAngelo A.B. (2004). Analysis of *in vivo* and *in vitro* DNA strand breaks from trihalomethane exposure. *Journal of Carcinogenesis* **3**, 2.

Geter D.R., George M.H., Moore T.M., Kilburn S., Huggins-Clark G., et DeAngelo A.B. (2004). Vehicle and mode of administration effects on the induction of aberrant crypt foci in the colons of male F344/N rats exposed to bromodichloromethane. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **67**, 23-29.

Gonzalez-Leon A., Schultz I.R., Xu G., et Bull R.J. (1997). Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate in the F344 rat after prior administration in drinking water. *Toxicology and Applied Pharmacology* **146**, 189-195.

Gottlieb M.S., Carr J.K., et Morris D.T. (1981). Cancer and drinking water in Louisiana : colon and rectum. *International Journal of Epidemiology* **10**, 117-125.

Green T., et Prout M.S. (1985). Species differences in response to trichloroethylene. II. Biotransformation in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **79**, 401-411.

Greenberg M.S., Burton G.A.Jr., et Fisher J.W. (1999). Physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled trichloroethylene and its oxidative metabolites in B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **154**, 264-278.

Gulati D.K., Hope E., Mounce R.C., Russell S., et Poonacha K.B. (1988). Chloroform: reproduction and fertility assessment in CD-1 mice when administered by gavage, NTP-89-018, NTIS PB89-148639. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC.

Haddad S., Béliveau M., Tardif R., et Krishnan K. (2001). A PBPK modeling-based approach to account for interactions in the health risk assessment of chemical mixtures. *Toxicological Sciences* **63**, 125-131.

Haddad S., et Krishnan K. (1998). Physiological modeling of toxicokinetic interactions: implications for mixture risk assessment. *Environmental Health Perspective* **106**, 1377-1384.

Haley J.A. (1999). Chloramination: The background to its introduction, and the management of nitrite formation in a water distribution system. Dans: *Disinfection by-products in drinking water. Current Issues.* (Fielding M., et Farrimond M., Eds.), pp. 78-87. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Harrington-Brock K., Doerr C.L., et Moore M.M. (1998). Mutagenicity of three disinfection by-products: di- and trichloroacetic acids and chloral hydrate in L5178Y/TK+/-3,7,2C mouse lymphoma cells. *Mutation Research* **413**, 265-276.

Herren-Freund S.L., Pereira M.A., Khoury M.D., et Olson G. (1987). The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid, in mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* **90**, 183-189.

Heywood R., Sortwell R.J., Noel P.R.B., Street A.E., Prentice D.E., Roe F.J.C., Wadsworth P.F., et Worden A.N. (1979). Safety evaluation of toothpaste containing chloroform III. Long-term study in beagle dogs. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* **2**, 835-851.

Hildesheim M.E., Cantor K.P., Lynch C.F., Dosemeci M., Lubin J., Alavanga M., et Craun G. (1998). Drinking water source and chlorination byproducts II. Risk of colon and rectal cancer. *Epidemiology* **9**, 29-35.

Hobara T., Kobayashi H., Kawamoto T., Iwamoto S., et Sakai T. (1988). The absorption of trichloroethylene and its metabolites from the urinary bladder of anesthetized dogs. *Toxicology* **48**, 141-153.

Hooth M.J., McDorman K.S., Hester S.D., George M.H., Brooks L.R., Swank A.E., et Wolf D.C. (2002) The carcinogenic response to *Tsc2* mutant Long-Evans (Eker) rats to a mixture of drinking water disinfection by-products was less than additive. *Toxicological Sciences* **69**, 322-331.

IJsselmuiden C.B., Gaydos C., Feighner B., Novakoski W.L., Serwadda D., Caris L.H., Vlahov D., et Comstock G.W. (1992). Cancer of the pancreas and drinking water: a population-based case-control study in Washington County, Maryland. *American Journal of Epidemiology* **136**, 836-842.

James M.O., Cornett R., Yan Z., Henderson G.N., et Stacpoole P.W. (1997). Glutathione-dependant conversion to glyoxylate, a major pathway of dichloroacetate bitransformation in hepatic cytosol from humans and rats, is reduced in dichloroacetate-treated rats. *Drug Metabolism and Disposition* **25**, 1223-1227.

James M.O., Yan Z., Cornett R., Jayanti V.M.K.M., Henderson G.N., Davydova N., Katovich M.J., Pollock B., et Stacpoole P.W. (1998). Pharmacokinetics and metabolism of (¹⁴C)dichloroacetate in male Sprague-Dawley rats. *Drug Metabolism and Disposition* **26**, 1134-1143.

Jo W.K., Weisel C.P., et Liroy P.J. (1990). Chloroform exposure and the health risk associated with multiple uses of chlorinated tap water. *Risk Analysis* **10**, 581-585.

Johansson J.S. (1997). Binding to the volatile anesthetic chloroform to albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 17961-17965.

Jorgenson T.A., Meierhenry E.F., Rushbrook C.J., Bull R.J., et Robinson M. (1985). Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice. *Fundamental and applied toxicology* **5**, 760-769.

Kanarek M.S., et Young T.B. (1982). Drinking water treatment and risk of cancer death in Wisconsin. *Environmental Health Perspective* **46**, 179-186.

Kaphalia B.S., Bhat H.K., Khan M.F., et Ansari G.A.S. (1992). Tissue distribution of monochloroacetic acid and its binding to albumin in rats. *Toxicology and Industrial Health* **8**, 53-61.

Kato-Weinstein J., Stauber A.J., Orner G.A., Thrall B.D., et Bull R.J. (2001). Differential effects of dihalogenated and trihalogenated acetates in the liver of B6C3F1 mice. *Journal of Applied Toxicology* **21**, 81-89.

Keegan T.E., Simmons J.E., et Pegram R.A. (1998). NOAEL and LOAEL determinations of acute hepatotoxicity for chloroform and bromodichloromethane delivered in aqueous vehicle to F344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **55**, 65-75.

Kim H., Haltmeier P., Klotz J.B., et Weisel C.P. (1999). Evaluation of biomarkers of environmental exposures: urinary haloacetic acids associated with ingestion of chlorinated drinking water. *Environmental Research, Section A* **80**, 187-195.

Kim H., et Weisel C.P. (1998). Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **8**, 555-575.

King W.D., Dodds L., et Allen A.C. (2000). Relations between stillbirth and specific chlorination by-products in public water supplies. *Environmental Health Perspectives* **108**, 883-886.

King W.D., Marrett L.D., Woolcott C.G. (2000). Case-control study of colon and rectal cancer and chlorination by-products in treated water. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**, 813-818.

King W.D., et Marrett L.D. (1996). Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes and Control* **7**, 596-604.

Klotz J.B., et Pyrch L.A. (1999). Neural tube defects and drinking water disinfection by-products. *Epidemiology* **10**, 383-390.

Kluwe W.M., McCormack K.M., et Hook J.B. (1978). Selective modification of the renal and hepatic toxicities of chloroform by induction of drug-metabolizing enzyme systems in kidney and liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **207**, 566-573.

Kramer M.D., Lynch C.F., Isacson P., et Hanson J.W. (1992). The association of waterborn chloroform with intrauterine growth retardation. *Epidemiology* **3**, 407-413.

Krishnan K., et Andersen M.E. (2001). Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. Dans: *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes A.W., Ed.), pp. 193-241. Taylor & Francis, Philadelphia.

Krishnan K., Paterson J., et Williams D.T. (1997). Health risk assessment of drinking water contaminants in Canada : the applicability of mixture risk assessment methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **26**, 179-187.

Kulling P., Andersson H., Bostrom K., Johannsson L.A., Lindstrom B., et Nystrom B. (1992). Fatal systemic poisoning after skin exposure to monochloroacetic acid. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* **30**, 643-652.

Larson J.L., et Bull R.J. (1992). Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **115**, 268-277.

Larson J.L., Wolf D.C., et Butterworth B.E. (1993). Acute hepatotoxic and nephrotoxic effects of chloroform in male F-344 rats and female B6C3F₁ mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **20**, 302-315.

Larson J.L., Wolf D.C., et Butterworth B.E. (1994b). Induced cytolethality and regenerative cell proliferation in the livers and kidneys of male B6C3F₁ mice given chloroform by gavage. *Fundamental and Applied Toxicology* **23** , 537-543.

Larson J.L., Wolf D.C., et Butterworth B.E. (1994a). Induced cytotoxicity and cell proliferation in the hepatocarcinogenicity of chloroform in female B6C3F₁ Mice: Comparison of administration by gavage in corn oil vs *ad libitum* in drinking water. *Fundamental and Applied Toxicology* **22**, 90-102.

Larson J.L., Wolf D.C., et Butterworth B.E. (1995). Induced regenerative cell proliferation in livers and kidneys of male F-344 rats given chloroform in corn oil by gavage or *ad libitum* in drinking water. *Toxicology* **95**, 73-86.

Lee S.C., Guo H., Lam S.M.J. et Lau S.L.A. (2004). Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. *Environmental Research* **94**, 47-56.

Lehninger A.L., Nelson D.L., et Cox M.M. (1993). Enzymes. Dans: Principles of biochemistry with an extended discussion of oxygen-binding proteins. pp. 198-239. Worth Publishers, New York.

Levallois P., Guévin N., Gingras S., Lévesque B., Weber J.P., et Letarte R. (1998). New patterns of drinking water consumption: results of a pilot study. *Science of the Total Environment* **218**, 1-7.

Lévesque B., Ayotte P., Tardif R., Charest-Tardif G., Dewailly É., Prud'homme D., Gingras G., Allaire S., et Lavoie R. (2000). Evaluation of the health risk associated with exposure to chloroform in indoor swimming pools. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **61**, 225-243.

Lévesque B., Ayotte P., Tardif R., Ferron L., Gingras S., Schlouch E., Gingras G., Levallois P., et Dewailly É. (2002). Cancer risk associated with household exposure to chloroform. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **65**, 489-502.

Liang L., et Singer P.C. (2003). Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomehtanes in drinking water. *Environmental Science and Technology* **37**, 2920-2928.

Lilly P.D., Andersen M.E., Ross T.M., et Pegram R.A. (1997b). Physiologically based estimation of in vivo rates of bromodichloromethane metabolism. *Toxicology* **124**, 141-152.

Lilly P.D., Andersen M.E., Ross T.M., et Pegram R.A. (1998). A physiologically based pharmacokinetic description of the oral uptake, tissue dosimetry, and rates of metabolism of bromodichloromethane in the male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **150**, 205-217.

Lilly P.D., Ross T.M., et Pegram R.A. (1997a). Trihalomethane comparative toxicity: Acute renal and hepatic toxicity of chloroform and bromodichloromethane following aqueous gavage. *Fundamental and Applied Toxicology* **40**, 101-110.

Lilly P.D., Simmons J.E., et Pegram R.A. (1994). Dose-dependent vehicle differences in the acute toxicity of bromodichloromethane. *Fundamental and Applied Toxicology* **23**, 132-140.

Lin E.L.C., Mattox J.K., et Davis M.E. (1993). Tissue distribution, excretion, and urinary metabolites of dichloroacetic acid in the male Fisher 344 rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **38**, 19-32.

Lipscomb J.C., Mahle D.A., Brashear W.T., et Barton H.A. (1995). Dichloroacetic acid: metabolism in cytosol. *Drug Metabolism and Disposition* **23**, 1202-1205.

Löfberg B., et Tjälve H. (1986). Tracing tissues with chloroform-metabolizing capacity in rats. *Toxicology* **39**, 13-35.

Mackay J.M., Fox V., Griffiths K., Fox D.A., Howard C.A., Coutts C., Wyatt I., et Styles J.A. (1995). Trichloroacetic acids: investigation into the mechanism of chromosomal damage in the in vitro human lymphocyte cytogenetic assay and the mouse bone marrow micronucleus test. *Carcinogenesis* **16**, 1127-1133.

Magnus P., Jaakola J.J.K., Skrondal A., Alexander J., Becher G., Krogh T., et Dybing E. (1999). Water chlorination and birth defects. *Epidemiology* **10**, 513-517.

Mather G.G., Exon J.H., et Koller L.D. (1990). Subchronic 90 day toxicity of dichloroacetic and trichloroacetic acid in the rat. *Toxicology* **64**, 71-80.

Maxwell N.I., Burmaster D.E., et Ozonoff D. (1991). Trihalomethanes and Maximum Contaminant Levels: the significance of inhalation and dermal exposures to chloroform in household water. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **14**, 297-312.

McDorman K.S., Hooth M.J., Starr T.B. et Wolf D.C. (2003). Analysis of preneoplastic and neoplastic renal lesions in *Tsc2* mutant Long-Evans (Eker) rats following exposure to a mixture of drinking water disinfection by-products. *Toxicology* **187**, 1-12.

McGeehin M.A., Reif J.S., Becher J.C., et Mangione E.J. (1993). Case-control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *American Journal of Epidemiology* **138**, 492-501.

McHugh Law J., Lopez L., et DeAngelo A.B. (1998). Hepatotoxicity of the drinking water disinfection by-product dichloroacetic acid, in the medaka small fish model. *Toxicology Letters* **94**, 19-27.

McKone T.E. (1993). Linking a PBPK model for chloroform with measured breath concentrations in showers: implications for dermal exposure models. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **3**, 339-365.

McMartin, K.E., et Collins, T.D. (1988). Distribution of oral 4-methylpyrazole in the rat : inhibition of elimination by ethanol. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* **26**, 451-466.

Melnick R.L., Kohn M.C., Dunnick J.K., et Leininger J.R. (1998). Regenerative hyperplasia is not required for liver tumor induction in female B6C3F1 mice exposed to trihalomethanes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **148**, 137-147.

Merck. (1989). The Merck Index. Merck & Co., Inc., Rahway.

Ministère de l'Environnement du Québec. (2001). Règlement sur la qualité de l'eau potable. pp. 1-27 Ministère de l'Environnement du Québec. Québec.

Mink F.L., Brown T.J., et Rickabaugh J. (1986). Absorption, distribution, and excretion of ¹⁴C-trihalomethanes in mice and rats. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **37**, 752-758.

Morimoto K., et Koizumi A. (1983). Trihalomethanes induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro* and mouse bone marrow cells *in vivo*. Environmental Research **32**, 72-79.

Munson A.E., Sain L.E., Sanders V.M., Kauffmann B.M., White Jr.K.L., Page D.G., Barnes D.W., et Borzelleca J.F. (1982). Toxicology of organic drinking water contaminants: trichloromethane, bromodichloromethane, dibromochloromethane and tribromomethane. Environmental Health Perspectives **46**, 117-126.

Murray F.J., Schwetz B.A., McBride J.C., et Staples R.E. (1979). Toxicity of inhaled chloroform in pregnant mice and their offspring. Toxicology and Applied Pharmacology **50**, 515-522.

Mush A. (1996). Toxicity of mixtures. Dans: Toxicology. Principles and Applications. (Niesink R.J.M., De Vries J., et Hollinger M.A., Eds.), pp. 270-287. CRC Press, Boca Raton.

Müller G., Spassovski M., et Henschler D. (1972). Trichloroethylene exposure and trichloroethylene metabolites in urine and blood. Archives of Toxicology **29**, 335-340.

Müller S.P., Wolna P., Wünscher U., et Pankow D. (1997). Cardiotoxicity of chlorodibromomethane and trichloromethane in rats and isolated rat cardiac myocytes. Archives of Toxicology **71**, 766-777.

Nakajima T., Elovaara E., Okino T., Gelboin H.V., Klockars M., Riihimäki V., Aoyama T., et Vainio H. (1995). Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **133**, 215-222.

Nakajima T., Wang R.S., Murayama N., et Sato A. (1990). Three forms of trichloroethylene-metabolizing enzyme in rat liver induced by ethanol, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *Toxicology and Applied Pharmacology* **102**, 546-552.

Narotsky M.G., Pegram R.A., et Kavlock R.J. (1997). Effect of dosing vehicle on the developmental toxicity of bromodichloromethane and carbon tetrachloride in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* **40**, 30-36.

National Cancer Institute (NCI). (1976). Report on the carcinogenesis bioassay of chloroform (CAS No. 67-66-3). Bethesda, MD: National Cancer Institute.

Nelson M.A., et Bull R.J. (1988). Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology* **94**, 45-53.

Neutra R.R., et Ostro B. (1992). An evaluation of the role of epidemiology in assessing current and future disinfection technologies for drinking water. *The Science of the Total Environment* **127**, 91-138.

Ni Y.-C., Wong T.-Y., Lloyd R.V., Heinze T.M., Shelton S., Casciano D., Kadlubar F.F., et Fu P.P. (1996). Mouse liver microsomal metabolism of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol leading to induction of lipid peroxidation via a free radical mechanism. *Drug Metabolism and Disposition* **24**, 81-90.

Nieuwenhuijsen M.J., Toledano M.B., Eaton N.E., Fawell J., et Elliot P. (2000). Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occupational and Environmental Medicine* **57**, 73-85.

NTP. (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of tribromomethane (bromoform) (CAS No. 75-25-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). TR-350.

Pankow D., Damme B., Wünscher U., et Bergmann K. (1997). Chlorodibromomethane metabolism to bromide and carbon monoxide in rats. *Archives of Toxicology* **71**, 203-210.

Parkinson A. (1996). Biotransformation of xenobiotics. Dans: Casarett & Doull's Toxicology (Klaassen C.D., Ed.), pp. 113-186. McGraw Hill, New York.

Patra S.K., et Pal M.K. (1997). Spectroscopic probes of the individual and combined effects of triton X-100 and chloroform on serum albumins and serum-albumin-bilirubin complexes. *European Journal of Biochemistry* **246**, 658-664.

Pereira M.A. (1996). Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **31**, 192-199.

Pereira M.A., Kramer P.M., Conran P.B., et Tao L. (2001). Effect of chloroform on dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of the *c-myc* gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice. *Carcinogenesis* **22**, 1511-1519.

Pereira M.A., Lin L.-H.C., Lippit J.M., et Herren S.L. (1982). Trihalomethanes as initiators and promoters of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **46**, 151-156.

Pohl L.R., Bhooshan B., Whittaker N.F., et Krishna G (1977). Phosgene: a metabolite of chloroform. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **79**, 684-691.

Pohl L.R., Martin J.L., et George J.W. (1980). Mechanism of metabolic activation of chloroform by rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **29**, 3271-3276.

Potter C.L., Chang L.W., DeAngelo A.B., et Daniel F.B. (1996). Effects of four trihalomethanes on DNA strand breaks, renal hyaline droplet formation and serum testosterone in male F-344 rats. *Cancer Letters* **106**, 235-242.

Ranmuthugala G., Pilotto L., Smith W., Vimalasiri T., Dear K., et Douglas R. (2003). Chlorinated drinking water and micronuclei in urinary bladder epithelial cells. *Epidemiology* **14**, 617-622.

Reitz R.H., Mendrala A.L., Corley R.A., Quast J.F., Gargas M.L., Andersen M.E., Staats D.A., et Conolly R.B. (1990). Estimating the risk of liver cancer associated with human exposures to chloroform using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicology and Applied Pharmacology* **105**, 443-459.

Richardson S.D., Caughram T.V., et Thruston A.D.Jr. (1999). Identification of drinking water disinfection by-products from ozone, chlorine dioxide, chloramine, and chlorine. Dans: *Disinfection by-products. Current Issues.* (Fielding M., et Farrimond M., Eds.), pp. 46-53. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Richmond R.E., Carter J.H., Carter H.W., Daniel F.B., et DeAngelo A.B. (1995). Immunohistochemical analysis of dichloroacetic acid (DCA) induced hepatocarcinogenesis in male Fischer (F344) rats. *Cancer Letters* **92**, 67-76.

Roy A., Weisel C.P., Liou P.J., et Georgopoulos P.G. (1996). A distributed parameter physiologically-based pharmacokinetic model for dermal and inhalation exposure to volatile organic compounds. *Risk Analysis* **16**, 147-160.

Ruddick J.A., Villeneuve D.C., et Chu I. (1983). A teratological assessment of four trihalomethanes in the rat. *Journal of Environmental Science and Health* **B18**, 333-349.

Saghir S.A., Fried K., et Rozman K.K. (2001). Kinetics of monochloroacetic acid in adult male rats after intravenous injection of a subtoxic and a toxic dose. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **296**, 612-622.

Santé Canada. (1993). Les trihalométhanes. pp. 1-16. Santé Canada. Ottawa.

Sarangapani R., Clewell H.J., Cruzan G., et Andersen M.E. (2002). Comparing respiratory-tract and hepatic exposure-dose relationships for metabolized inhaled vapors: a pharmacokinetic analysis. *Inhalation Toxicology* **14**, 835-854.

Savitz D.A., Andrews K.W., et Pastore L.M. (1995). Drinking water and pregnancy outcome in central North Carolina: source, amount, and trihalomethane levels. *Environmental Health Perspective* **103**, 592-596.

Schultz I.R., Merdink J.L., Gonzalez-Leon A., et Bull R.J. (1999). Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **158**, 103-114.

Schwets B.A., Leong B.J.K., et Gehring P.J. (1974). Embryo- and fetotoxicity of inhaled chloroform in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **28**, 442-451.

Simmons J.E., Teuschler L.K., Gennings C. (2001). The toxicology of disinfection by-product mixtures: methods for multichemical assessment, present research efforts, and future directions. Dans: Microbial pathogens and disinfection by-products in drinking water. Health effects and management of risks. (Craun G.F., Hauchman F.S., et Robinson D.E., Eds.), pp. 325-340. ILSI Press, Washington, DC.

Simmon V.F., Kauhanen K., et Tardiff R.G. (1977). Mutagenic activity of chemicals identified in water. *Developmental Toxicology and Environmental Science* **2**, 249-258.

Smith A.E., et Evans J.S. (1995b). Uncertainty in fitted estimates of apparent *in vivo* metabolic constants for chloroform. *Fundamental and Applied Toxicology* **25**, 29-44.

Smith A.E., Gray G.M., et Evans J.S. (1995a). The ability of predicted internal dose measures to reconcile tumor bioassay data for chloroform. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **21**, 339-351.

Stacpoole P.W., Harwood, J. H. J., Cameron D.F., Curry S.H., Samuelson D.A., Cornwell P.E., et Sauberlich H.E. (1990). Chronic toxicity of dichloroacetate: possible relation to thiamine deficiency in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* **14**, 327-337.

Stacpoole P.W., Henderson G.N., Yan Z., et James M.O. (1998). Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environmental Health Perspectives* **106**, 989-994.

Stenner R.D., Merdink J.L., Fisher J.W., et Bull R.J. (1998). Physiologically-based pharmacokinetic model for trichloroethylene considering enterohepatic recirculation of major metabolites. *Risk Analysis* **18**, 261-269.

Stenner R.D., Merdink J.L., Stevens D.K., Springer D.L., et Bull R.J. (1997). Enterohepatic recirculation of trichloroethanol glucuronide as a significant source of trichloroacetic acid. Metabolites of trichloroethylene. *Drug Metabolism and Disposition* **25**, 529-535.

Stevens D.K., Eyre R.J., et Bull R.J. (1992). Adduction of hemoglobin and albumin *in vivo* by metabolites of trichloroethylene, trichloroacetate, and dichloroacetate in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **19**, 336-342.

Stevens J.L., et Anders M.W. (1979). Metabolism of haloforms to carbon monoxide. III. Studies on the mechanism of the reaction. *Biochemical Pharmacology* **28**, 3189-3194.

Tao L., Yang S., Xie M., Kramer P.M., et Pereira M.A. (2000). Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Letters* **158**, 185-193.

Tardif R., Charest-Tardif G., Brodeur J., et Krishnan K. (1997). Physiologically based pharmacokinetic modeling of a ternary mixture of alkyl benzenes in rats and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144**, 120-134.

Testai E., De Curtis V., Gemma S., Fabrizi L., Gervasi P., et Vittozzi L. (1996). The role of different cytochrome P450 isoforms in *in vitro* chloroform metabolism. *Journal of Biochemical Toxicology* **11**, 305-312.

Testai E., Di Marzio S., et Vittozzi L. (1990). Multiple activation of chloroform in hepatic microsomes from uninduced B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **104**, 496-503.

Testai E., et Vittozzi L. (1984). Different pathways of chloroform metabolism. *Archives of Toxicology, Supplement* **7** 278-281.

Thompson D.J., Warner, S.D., et Robinson V.B. (1974). Teratology studies on orally administered chloroform in the rat and rabbit. *Toxicology and Applied Pharmacology* **29**, 348-357.

Thornton-Manning J.R., Seely J.C., et Pegram R.A. (1994). Toxicity of bromodichloromethane in female rats and mice after repeated oral dosing. *Toxicology* **94**, 3-18.

Tomasi A., Albano E., Biasi F., Slater T.F., Vannini V., et Dianzani M.U. (1985). Activation of chloroform and related trihalomethanes to free radical intermediates in isolated hepatocytes and in the rat in vivo as detected by the esr-spin trapping technique. *Chemico-Biological Interactions* **55**, 303-316.

Toussaint M.W., Rosencrance A.B., Brennan L.M., Beaman J.R., Wolfe M.J., Hoffmann F.J., et Gardner, Jr. H. S. (2001). Chronic toxicity of chloroform to japanese medaka fish. *Environmental Health Perspective* **109**, 35-40.

Toxopeus C, et Frazier J.M. (1998). Kinetics of trichloroacetic acid and dichloroacetic acid in the isolated perfused rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* **152**, 90-98.

Tumasonis C.F., McMartin D.N., et Bush B. (1987). Toxicity of chloroform and bromodichloromethane when administered over a lifetime in rats. *JEPTO* **7**, 55-64.

Uden P.C., et Miller J.W. (1983). Chlorinated acids and chloral in drinking water. *Journal of American Water Works Association* **75**, 524-527.

USEPA. (2001). Toxicological review of chloroform. CAS No. 67-66-3. In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/65/R-01/002. Washington, DC. www.epa.gov/iris.htm

USEPA. (2003). Chloroform. CASRN 67-66-3. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0025.htm

USEPA. (2002a). Bromodichloromethane. CASRN 75-27-4. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0213.htm

USEPA. (2002b). Dibromochloromethane. CASRN 124-48-1. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0535.htm

USEPA. (2002c). Bromoform. CASRN 75-25-2. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0214.htm

USEPA. (2002d). Dichloroacetic acid. CASRN 79-43-6. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0654.htm

USEPA. (2002e). Trichloroacetic acid. CASRN 76-03-9. Integrated Risk Information System. www.epa.gov/iris/subst/0635.htm

Ville de Montréal. (2002). Rapport sur la qualité de l'eau potable produite par la ville de Montréal. 2001. Montréal.

Vogt C.R., Liao J.C., et Sun A.Y. (1980). Extraction and determination of chloroform in rat blood and tissues by gas chromatography-electron-capture detection: Distribution of chloroform in the animal body. *Clinical Chemistry* **26**, 66-68.

Waller K., Swan S.H., DeLorenze G., et Hopkins B. (1998). Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology* **9**, 134-140.

WHO. (1994). Chloroform. (163). International Program on Chemical Safety. Environmental Health Criteria. Geneva.

WHO. (1996). Guidelines for drinking water quality. WHO. Geneva.

WHO. (2002). Disinfectant and disinfectant by-products. WHO. Geneva.

WHO. (2002). Disinfection. WHO seminar pack for drinking water quality. Geneva.

Wilkins J.R.III, et Comstock G.W. (1981). Source of drinking water at home and site-specific cancer incidence in Washington County, Maryland. American Journal of Epidemiology **114**, 178-190.

Williams D.T., LeBel G.L., et Benoit F.M. (1997). Disinfection by-products in canadian drinking water. Chemosphere **34**, 299-316.

Withey J.R., Collins B.T., et Collins P.G. (1983). Effect of vehicle on the pharmacokinetics and uptake of four halogenated hydrocarbons from the gastrointestinal tract of the rat. Journal of Applied Toxicology **3**, 249-253.

Woodard G., Lange S.W., Nelson K.W., et Calvery H.O. (1941). The acute oral toxicity of acetic, chloroacetic, dichloroacetic and trichloroacetic acids. Journal of Industrial Hygiene and Toxicology **23**, 78-82.

Xu X., Mariano T.M., Laskin J.D., et Weisel C.P. (2002). Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. Toxicology and Applied Pharmacology **184**, 19-26.

Yang C.-Y., Chen B.-H., Tsai S.-S., Wu T.-N., Lin M.-C., et Lin K.-C. (2000). Association between chlorination of drinking water and adverse pregnancy outcome in Taiwan. Environmental Health Perspective **108**, 765-768.

Yang H.-M., et Davis M.E. (1997). Dichloroacetic acid pretreatment of male and female rats increase chloroform metabolism in vitro. *Toxicology* **124**, 53-62.

Yang H.-M., Houser W.H., et Davis M.E. (1996). Dichloroacetic acid treatment increases hepatic CYP2E1 in male and female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141**, 382-388.

Yllner S. (1971). Metabolisme of chloroacetate-1-14C in the mouse. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **30**, 69-80.

Young T.B., Kanarek M.S., et Tsiatis A.A. (1981). Epidemiologic study of drinking water chlorination and Wisconsin female cancer mortality. *Journal of National Cancer Institute* **67**, 1191-1198.

Young T.B., Wolf D.A., et Kanarek M.S. (1987). Case-control study of colon cancer and drinking water trihalomethanes in Wisconsin. *International Journal of Epidemiology* **16**, 90-98.

Yu K.O., Barton H.A., Mahle D.A., et Frazier J.M. (2000). In Vivo kinetics of trichloroacetate in male Fischer 344 rats. *Toxicological Sciences* **54**, 302-311.

