

**Université de Montréal**

**Évaluation du risque cancérigène associé à la contamination de l'eau  
potable de puits municipaux par les nitrates/nitrites  
dans certaines régions rurales du Québec**

présenté par

**Sandrine Fleur Chébékoué**

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences en

Santé environnementale et santé au travail

Décembre, 2008

© Sandrine Fleur Chébékoué, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation du risque cancérigène associé à la contamination de l'eau  
potable de puits municipaux par les nitrates/nitrites  
dans certaines régions rurales du Québec**

présenté par :

Sandrine Fleur Chébékoué

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Ada Vyskocil, président-rapporteur

Docteur Robert Tardif, directeur de recherche,

Docteur Patrick Levallois, codirecteur de recherche

Docteur Kannan Krishnan, membre du jury

Mémoire accepté le : 23 Décembre 2008

## Résumé

La spécialisation des techniques agricoles que nous connaissons ces dernières décennies, particulièrement dans les régions rurales, est à l'origine de l'abus de fertilisants. Ces derniers sont actuellement reconnus comme étant les causes principales de la contamination de l'eau souterraine par les nitrates. Suite à leur ingestion *via* l'eau potable, les nitrates sont transformés en nitrites par la flore buccale. Une fois dans l'estomac les nitrites réagissent avec certaines amines provenant de l'alimentation pour générer des nitrosamines cancérigènes. L'objectif de notre étude était d'estimer quantitativement l'excès de risque de cancer (ER) pour les populations de sept régions rurales du Québec qui consomment l'eau potable provenant de réseaux municipaux alimentés en eau souterraine. Le territoire à l'étude était caractérisé par une agriculture intensive d'élevage. Les médianes (et 95<sup>e</sup> centiles) régionales des concentrations de nitrates mesurées dans les réseaux de ces régions étaient de : 0,18 (2,74); 0,48 (10,35); 0,15 (1,28); 0,32 (11); 0,05 (0,76); 0,10 (4,69); 0,09 (2,13) mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l. Nous avons envisagé un scénario de transformation complète des nitrites et de certaines amines (diméthylamine, diéthylamine, n-butylamine, méthyléthylamine) en nitrosamines spécifiques : N-diméthylnitrosamine (NDMA), N-diéthylnitrosamine (NDEA), N-n-dibutylnitrosamine (NDBA) et N-méthyléthylnitrosamine (NMEA). Pour estimer la concentration de nitrites formés dans l'estomac, nous avons considéré une consommation définie d'eau potable, le volume de l'estomac et un taux de transformation des nitrates en nitrites. Supposant les quantités de nitrites et de chaque amine constantes pendant 1h, nous avons considéré la constante de nitrosation spécifique à chaque amine pour évaluer la dose d'exposition journalière à chaque nitrosamine équivalente formée. Par la suite, la combinaison de cette dose à un estimateur de potentiel cancérigène  $q_{\text{humain}}$  spécifique à chaque nitrosamine, nous a permis d'évaluer l'ER associé à chacune d'elles. Globalement l'analyse a démontré que les ER les plus élevés, estimés pour le NDBA, étaient de l'ordre de 10<sup>-6</sup>, ne contribuant pas de façon significative à une augmentation du risque de cancer pour ces populations.

**Mots clés :** amines, cancer, composés N-nitrosés, eau potable, nitrates, nitrites, nitrosation endogène, nitrosamines.

## Summary

Specialization of agricultural practices in rural regions over the past few decades has led to overuse of fertilizers which are main causes of groundwater contamination by nitrates. After their ingestion through drinking water, nitrates are transformed into nitrites by the oral flora. Once in the stomach, nitrites react with some amines from food supply to form nitrosamines with some being probably carcinogenic to humans. The aim of this study was to quantitatively estimate the possible excess cancer risk (ER) for populations of seven rural regions in Quebec that consume water from public drinking water systems using groundwater. The studied regions practice extensive breeding agriculture. The regional medians (and 95<sup>th</sup> percentile) of nitrate levels in water from those seven regions were: 0.18 (2.74); 0.48 (10.35); 0.15 (1.28); 0.32 (11); 0.05 (0.76); 0.10 (4.69) and 0.09 (2.13) mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, respectively. Indeed, we first considered a scenario of complete transformation of nitrites and some amines (dimethylamine, diethylamine, n-butylamine and methylethylamine) into specific nitrosamines: N-dimethylnitrosamine (NDMA), N-diethylnitrosamine (NDEA), N-nitrosodi-n-butylamine (NDBA) and N-nitrosomethylethylamine (NMEA). Gastric nitrite concentrations were estimated on the basis of defined drinking water intake, stomach volume, and the transformation rate of nitrates into nitrites. Considering that levels of nitrites and each amine were kept constant for 1 hour, and taking in account the nitrosatability rate constant specific to each amine, we then estimated the daily doses of the corresponding endogenously formed nitrosamines. Furthermore combination of dose with the human cancer potency factor  $q_{\text{human}}$  specific to each nitrosamine, allowed the estimation of excess cancer risk. The highest ER estimated for NDBA was in the order of  $10^{-6}$ , thus not contributing to a significant increase in the risk of cancer for that population.

**Keywords:** amines, cancer, drinking water, endogenous nitrosation, nitrates, nitrites, N-nitroso compounds, nitrosamines.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>PAGE TITRE.....</b>	<b>i</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY.....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xi</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. CHAPITRE I: INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CHAPITRE II: REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>5</b>
2.1 NITRATES ET NITRITES .....	6
2.1.1 <i>Identité et propriétés physico-chimiques</i> .....	6
2.1.2 <i>Utilisations</i> .....	7
2.1.3 <i>Sources</i> .....	8
2.1.3.1 Sources naturelles (cycle de l'azote).....	8
2.1.3.2 Sources anthropiques .....	9
2.1.4 <i>Devenir environnemental</i> .....	10
2.2 NITRATES (N <sup>o</sup> CAS 14797-55-8).....	11
2.2.1 <i>Exposition</i> .....	11
2.2.1.1 Alimentation .....	11
2.2.1.2 Eau .....	12
2.2.1.3 Air.....	13
2.2.1.4 Estimation de l'exposition exogène totale et contribution relative de l'eau potable à l'apport.	14
2.2.1.5 Synthèse endogène.....	15
2.2.2 <i>Pharmacocinétique et biotransformation</i> .....	16
2.3 NITRITES (N <sup>o</sup> CAS 14797-65-0) .....	18
2.3.1 <i>Exposition</i> .....	18
2.3.1.1 Alimentation .....	18
2.3.1.2 Eau .....	19
2.3.1.3 Air.....	19
2.3.1.4 Synthèse endogène.....	19
2.3.2 <i>Pharmacocinétique et biotransformation</i> .....	20
2.3.3 <i>Taux de transformation des nitrates en nitrites</i> .....	21
2.4 COMPOSÉS N-NITROSÉS .....	21
2.4.1 <i>Origine et propriétés physico-chimiques</i> .....	22

2.4.2	<i>Exposition humaine</i> .....	23
2.4.3	<i>Toxicité et cancérogénicité</i> .....	24
2.4.4	<i>Indice de potentiel cancérigène</i> .....	25
2.4.5	<i>Cas particulier des nitrosamines</i> .....	33
2.4.5.1	Origine.....	33
2.4.5.2	Précurseurs aminés .....	34
2.4.5.3	Cinétique de la N-nitrosation (constante de nitrosation).....	35
2.4.5.4	NPRO test.....	39
2.4.5.5	Modulateurs de la N-nitrosation .....	40
2.4.5.6	Biotransformation et toxicité .....	44
2.4.5.7	Classification .....	48
2.5	ÉTUDES ANIMALES DE TOXICITÉ DES NITRATES ET NITRITES.....	48
2.5.1	<i>Toxicité aigue</i> .....	48
2.5.2	<i>Toxicité sub-chronique</i> .....	48
2.5.3	<i>Toxicité chronique</i> .....	49
2.5.4	<i>Mutagénicité et génotoxicité</i> .....	49
2.5.5	<i>Cancérogénicité</i> .....	49
2.5.6	<i>Effets sur la reproduction et le développement</i> .....	50
2.6	EFFETS SUR LA SANTÉ HUMAINE .....	51
2.6.1	<i>Méthémoglobinémie</i> .....	51
2.6.2	<i>Effets sur la reproduction et le développement</i> .....	54
2.6.3	<i>Cancer</i> .....	55
2.6.4	<i>Autres effets</i> .....	56
2.7	NORMES ET RECOMMANDATIONS.....	57
2.7.1	<i>Doses journalières acceptables (DJA)</i> .....	58
2.7.2	<i>Normes québécoises</i> .....	58
2.7.3	<i>Recommandations canadiennes</i> .....	59
2.7.4	<i>Normes américaines</i> .....	59
2.7.5	<i>Critères de l’OMS</i> .....	59
2.8	MÉTHODES D’ANALYSE ET TECHNIQUES DE TRAITEMENT.....	60
<b>3.</b>	<b>CHAPITRE III : PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>61</b>
3.1	PROBLÉMATIQUE .....	62
3.2	OBJECTIFS.....	66
3.3	MÉTHODOLOGIE .....	66
3.3.1	<i>Territoire à l’étude</i> .....	67
3.3.2	<i>Évaluation du potentiel dangereux</i> .....	69
3.3.3	<i>Caractérisation de la toxicité</i> .....	70
3.3.4	<i>Estimation de l’exposition de la population</i> .....	73
3.3.5	<i>Évaluation du risque</i> .....	75
3.3.5.1	Estimation du risque .....	75
3.3.5.2	Caractérisation du risque .....	76
<b>4</b>	<b>CHAPITRE IV: ARTICLE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>CHAPITRE V: DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>115</b>

5.1	DISCUSSION .....	116
5.2	CONCLUSION .....	119
<b>6</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>138</b>

## LISTE DES FIGURES

### 3. CHAPITRE I : INTRODUCTION

**Figure 1.** Régions couvrant le territoire à l'étude .....4

### 4. CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE

**Figure 2.** Biotransformation de la N-diméthylnitrosamine.....46

### 5. CHAPITRE IV : ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Figure 1.** Sensitivity analysis.....114



## LISTE DES TABLEAUX

### 1. CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE

<b>Tableau 1.</b> Propriété physico-chimiques des nitrates et nitrites.....	6
<b>Tableau 2.</b> Indices de cancérogénicité utilisés pour l’analyse de risque et leurs caractéristiques.....	31
<b>Tableau 3.</b> Manifestations cliniques dues au taux de méthémoglobine dans le sang.....	52
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques des bassins versants des rivières drainant les diverses régions étudiées.....	68
<b>Tableau 5.</b> Nitrosamines et études animales de cancérogénicité.....	71

### 2. CHAPITRE IV : ARTICLE SCIENTIFIQUE

<b>Table 1.</b> Nitrate concentrations in drinking water systems of the four regions studied supplied with groundwater.....	108
<b>Table 2.</b> Classification of nitrate levels in the drinking water systems.....	109
<b>Table 3.</b> Total daily intakes of amines (mg/day).....	110
<b>Table 4.</b> Daily doses of nitrosamines ( $\mu\text{g}/\text{day}$ ) calculated from a randomly generated sample of 10 000.....	111
<b>Table 5.</b> Estimation of excesses cancer risk resulting from the endogenous exposure to specific nitrosamine.....	112

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AQT : apport quotidien total

CalEPA : California Environmental Protection Agency

CEAEQ : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CMA : concentration maximale acceptable

DJA : dose journalière acceptable

ENOC : composés N-nitrosés endogènes

EPA : Environmental Protection Agency

ER: Excès de risque de cancer

NDBA: N-nitrosodi-n-butylamine

NDEA: N-nitrosodiéthylamine

NDMA: N-nitrosodiméthylamine

NMEA: N-nitrosométhyléthylamine

NOAEL (no observed adverse effect level): concentration sans effet nocif observé

NOC : composés N-nitrosés

NOEL (no observed effect level): concentration sans effet observé

MDDEP : Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec

LMS : Linearized multistage

LD<sub>50</sub>: dose létale 50

OEHHA : Office of Environmental Health Hazard Assessment (Gouvernement de Californie)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RfD : dose de référence

## REMERCIEMENTS

La rédaction de ce mémoire s'est faite avec la précieuse collaboration de personnes dont je suis particulièrement fière. Comme le dit si bien cet adage : « Les paroles s'envolent, seuls les écrits restent ... » Je suis donc tout à fait heureuse d'avoir l'occasion de témoigner à chacune de ces personnes uniques, et ce de façon permanente, ma reconnaissance et ma gratitude pour tout leur soutien. Je commencerai tout d'abord par remercier mes directeurs de recherche Robert Tardif, Patrick Levallois ainsi que Manuel Rodriguez. Ma relation avec eux fût tout à fait remarquable et je tiens une fois de plus à leur souligner mon plus profond respect. J'ai tellement appris d'eux le sens des priorités, la gestion de plusieurs dossiers et j'en passe. Je tiens aussi à mettre l'emphase sur leur simplicité, disponibilité et respect qui m'ont donnée beaucoup d'aisance dans l'accomplissement de ma tâche. De plus, leurs conseils judicieux m'ont permis de mener à bien les nombreux projets (colloques, conférences,...) que j'ai réalisés tout au long de mes années d'études.

Je tiens aussi à remercier Mme Ginette Charest-Tardif pour son soutien autant technique que moral, particulièrement dans les moments où j'étais très désemparée.

Mes remerciements les plus sincères à Monsieur Claude Émond pour sa collaboration dans certains de mes travaux, sa patience incommensurable, et par-dessus tout, sa volonté perpétuelle pour aider.

Je tiens aussi à souligner l'appui financier sous forme de bourse des Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Une pensée spéciale à mon amie Calline qui a toujours été disponible pour moi et m'a été d'un très grand soutien moral.

Je ne saurai terminer sans remercier de façon particulière, tous les membres de ma famille et ce sans exception pour leur attention spéciale et leur réconfort perpétuel malgré la distance. Je vous aime tant!

Très loin des yeux, mais près du cœur ...

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un vaste projet d'« action concertée entre le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) » portant sur la protection des sources d'eau potable municipales en milieu agricole du Québec. Plus précisément, il fait partie de l'un des cinq volets du projet dont le but était d'évaluer l'impact sanitaire associé à la présence des nitrates/nitrites dans l'eau potable de certaines régions agricoles du Québec.

L'abus de fertilisants pour amender les sols serait à l'origine de la contamination des eaux souterraines par les nitrates/nitrites dans les régions à vocation fortement agricole. Et l'ingestion subséquente d'eau contaminée par ces substances pourrait induire des risques de cancer *via* la formation endogène de nitrosamines cancérigènes. Cependant la preuve d'un lien direct de causalité entre le cancer et la présence de nitrates dans l'eau reste encore à être validée du fait de la difficulté à évaluer l'exposition endogène aux nitrosamines. Les résultats d'études épidémiologiques axées sur le sujet restent très ambigus et controversés. Par ailleurs, du côté des expérimentations animales, la cancérogénicité des nitrosamines ne fait pas de doute. Les résultats soutiennent majoritairement l'augmentation du risque de cancer de divers organes par l'intermédiaire de la formation endogène de nitrosamines cancérigènes. Malheureusement, la formation de ces dernières fait intervenir divers paramètres (acidité - pH, quantités d'amines alimentaires, taux de transformation des nitrates en nitrites) dont l'évaluation est très complexe. Par ailleurs, l'enjeu éthique que soulèverait l'expérimentation humaine complique d'avantage l'évaluation du risque suite à l'exposition humaine. Seules les données d'études animales restent donc à portée de main pour évaluer la toxicité de ces substances. Jusqu'ici tout n'est pas résolu car les nitrosamines constituent une très grande famille de composés aux caractéristiques parfois variables. Face à tout cet amalgame de difficultés, des modèles mathématiques ont été développés dans le but de prédire des probabilités d'excès de risque de cancer résultant de l'ingestion de nitrates/nitrites. Nous développons ici l'un de ces modèles qui a été successivement mis au point par nos prédécesseurs et qui, nous espérons, inspirera

d'autres après nous. En fait nous croyons qu'un pareil modèle serait très utile pour enfin estimer des risques hypothétiques de cancer malgré les nombreuses limites inhérentes à l'évaluation de l'exposition endogène aux nitrosamines cancérigènes. J'espère par-dessus tout que ce projet puisse susciter l'intérêt d'autres chercheurs pour cette problématique, car la validation de ce modèle pourrait enfin permettre de prendre en compte le risque de cancer dans l'établissement des normes de nitrates/nitrites dans l'eau potable.

Puisqu'il faille bien commencer quelque part, j'espère que ce mémoire inspirera et suscitera l'intérêt de plus d'un pour ce qui est de la problématique nitrates/nitrites et cancer, qui à mon humble avis, n'a pas dit son dernier mot.

Le présent mémoire a été rédigé sous forme d'article scientifique. Les sept régions qui ont été étudiées se retrouvent le long de la vallée du fleuve St-Laurent dans la province du Québec (Canada). Il s'agit de zones rurales dont l'agriculture constitue parfois l'activité économique principale. Ces régions sont les suivantes : Bas-St-Laurent, Capitale-Nationale, Centre-du-Québec, Chaudière-Appalaches, Estrie, Lanaudière, Montérégie. Pour des besoins de clarté et de légèreté, seuls les résultats de quatre de ces régions ont été présentés dans l'article scientifique. Il s'agit de celles dont les moyennes régionales de concentrations de nitrates étaient les plus élevées. Les résultats des trois autres régions sont présentés en annexes, à la fin du document.

# **1. CHAPITRE I: INTRODUCTION**

La contamination de l'eau potable par les nitrates/nitrites constituerait un risque de cancer pour les populations exposées. En effet, une fois ingérés, les nitrates sont transformés par la flore buccale en nitrites. Dans l'estomac ces derniers transformeraient les précurseurs nitrosables (amines et amides) provenant largement de l'alimentation, en composés N-nitrosés (NOC) cancérigènes. La formation endogène de ces substances, encore appelée « nitrosation endogène », contribuerait jusqu'à 75% environ à leur exposition totale (Jakszyn et Gonzalez 2006b; Tricker 1997). Cette forte contribution de la nitrosation endogène en lien indirect avec le couple nitrates/nitrites, suscite l'intérêt pour l'évaluation du risque hypothétique de cancer qui pourrait être associé à l'ingestion de ces substances.

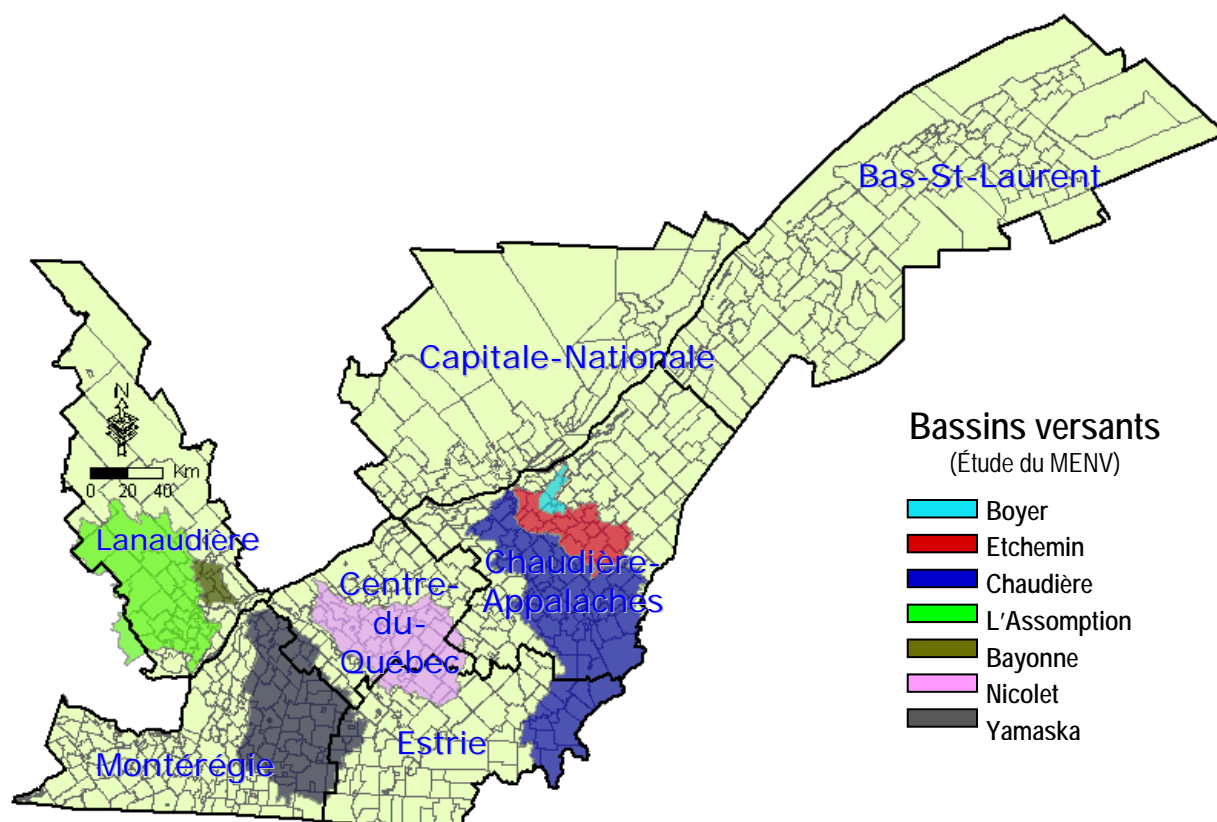
Au Québec, l'adoption du règlement sur la qualité de l'eau potable en 2001 (Gouvernement du Québec 2001) a eu quelques répercussions dans les municipalités. En effet ce règlement impose des normes de qualité plus strictes, particulièrement pour les réseaux alimentés en eaux de surface qui doivent dorénavant filtrer et désinfecter leurs eaux. C'est ainsi que ces exigences du nouveau règlement s'accompagnent de coûts parfois très élevés pour les municipalités visées. Pire encore, ces dernières sont généralement de petites municipalités rurales dont les activités économiques principales sont agricoles et de surcroît les plus intenses de la province (Gravel 2006). On comprend aisément pourquoi l'eau souterraine est communément utilisée comme principale source d'approvisionnement en eau potable par ce type de municipalités (Gravel 2006; Gélinas et al. 2004).

Par ailleurs, les activités agricoles et d'élevage se sont beaucoup spécialisées ces dernières années. C'est ainsi que dans certaines régions agricoles du Québec, les nombres d'unités animales (UA, représente la concentration d'animaux d'élevage par unité de surface) très élevés créent des pressions de plus en plus préoccupantes sur l'environnement. C'est aussi le cas des fertilisants (chimiques et fumier) dont les quantités utilisées aux fins de l'amendement des sols dépassent largement les besoins naturels des sols (Gravel 2006; Gélinas et al. 2004).

L'eau souterraine que l'on exploite au Québec circule dans les 100 premiers mètres de profondeur (MDDEP 2007). D'après Madison et Brunett (1985), à cette profondeur l'eau serait très vulnérable à la contamination par les nitrates issus de la fertilisation abusive des sols. Ainsi, compte tenu des pressions agricoles très élevées sur les sols d'une part, et du fait que les municipalités rurales s'approvisionnent principalement en eau souterraine d'autre part, il serait raisonnable de penser que les eaux de celles-ci soient possiblement contaminées par les nitrates.

Les régions étudiées dans le cadre de ce projet sont très fortement agricoles (figure 1) et représentent environ 45% de la population québécoise desservie par l'eau souterraine. Compte tenu de ce qui vient d'être mentionné, les populations de ces régions seraient donc vraisemblablement exposées aux eaux contaminées par les nitrates. La présente évaluation du risque de cancer pour les populations de ces régions est donc pleinement justifiée par l'association possible entre les nitrates contaminant l'eau et le risque de cancer.





**Figure 1.** Régions couvrant le territoire à l'étude<sup>1</sup>

<sup>1</sup> D'après Gravel C. 2006. Impact des pressions agricoles sur la qualité de l'eau des réseaux d'aqueducs municipaux du Québec alimentés en eau souterraine. Québec: Université Laval.

## **2. CHAPITRE II: REVUE DE LITTÉRATURE**

## 2.1 Nitrates et Nitrites

### 2.1.1 Identité et propriétés physico-chimiques

	Nitrate	Nitrite
<b>Formule chimique</b>	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$
<b>N°CAS</b>	14797-55-8	14797-65-0
<b>Poids moléculaire</b>	62	46
<b>Propriétés acido-basiques</b>	Base conjuguée d'acide fort : $\text{HNO}_3$ (pKa = 1,3)	Base conjuguée d'acide faible : $\text{HNO}_2$ (pKa = 3,4)
<b>pH en solution aqueuse</b>	5 à 8	~ 9
<b>Solubilité dans l'eau</b>	Sels très solubles	Sels très solubles
<b>Volatilité</b>	Non volatile	Non volatile

**Tableau 1.** Propriétés physico-chimiques des nitrates et nitrites. Les données ont été extraite de : OMS (2007)

Le nitrate et le nitrite sont des ions ubiquitaires naturellement présents dans la biosphère. Le nitrate est un nutriment essentiel pour la vie de divers organismes (plantes, animaux, hommes). En effet, l'azote qui est essentiel à la synthèse protéique des plantes est principalement prélevé par celles-ci sous la forme de nitrate. Ce dernier provient des fertilisants chimiques ou de la conversion des autres formes organiques de l'azote (Chung et al. 2003). En plus d'être chimiquement inerte, le nitrate constitue la forme la plus stable de toutes les formes d'azote combinées à l'oxygène (OMS 2007). C'est donc en raison de cette stabilité relative que la plupart des autres formes d'azote de l'environnement auront tendance à se transformer en nitrates. Par conséquent, toutes les sources d'azote combiné (organique ou minéral –  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) devraient être considérées comme des sources potentielles de nitrates (OMS 2007; Santé Canada 1987).

L'ion nitrite quant à lui contient l'atome d'azote dans un état d'oxydation relativement instable. Les processus chimiques et biologiques pourront plus tard réduire cet ion en plusieurs autres composés ou l'oxyder en nitrate.

### 2.1.2 Utilisations

Le nitrate est principalement utilisé comme fertilisant inorganique. Étant donné qu'il est essentiel à la croissance des plantes, des quantités adéquates de cet élément doivent parfois être fournies sous forme de fertilisants, selon le type de culture et la période d'épandage. Il est aussi très utilisé comme agent oxydant (synthèse de dérivés nitrés, de l'oxyde nitreux, de ciments spéciaux), pour la coagulation des latex, dans l'industrie nucléaire, dans la fabrication d'explosifs (pyrotechnique) et dans l'industrie du verre (OMS 2007). Dans l'industrie alimentaire, on l'utilise comme colorant et agent de conservation, principalement sous formes nitrate de potassium ou de sodium. On l'utilise aussi pour le contrôle des corrosions dans les réseaux de distribution d'eau potable (IPCS 1999).

Les nitrites quant à eux sont essentiellement utilisés comme colorant et agent de conservation des aliments. C'est le cas des viandes et dérivés dans lesquels le nitrite de sodium est ajouté non seulement pour la salaison, mais aussi pour préserver le goût et la couleur rouge de l'hémoglobine qui autrement serait oxydée pour devenir brune (Dietrich et al. 2005). Cette utilisation du nitrite qui est très réglementée dans la plupart des pays, se fait surtout dans le but de prévenir le botulisme. Celui-ci est causé par les toxines produites par des souches de *Clostridium botulinum*. Cette bactérie se retrouve parfois dans la viande crue et pourrait même persister après la cuisson de celle-ci (Santé Canada 2004a; ACIA 2006).

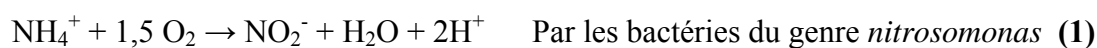
Les nitrites sont aussi utilisés dans la manufacture des teintures et du caoutchouc, dans l'industrie textile et photographique. Ils servent aussi d'inhibiteur de corrosion et d'antidote dans des cas d'empoisonnement au cyanure (IPCS 1999). Dans l'industrie, ils sont utilisés pour transformer des amines en sels de diazonium qui sont des colorants organiques.

### 2.1.3 Sources

En général, les sources de nitrates dans l'eau (en particulier les eaux souterraines) sont les suivantes : les organismes animaux et végétaux en décomposition, les rejets animaux et humains (fosses septiques et égouts défectueux), les engrais inorganiques à base d'azote, l'épandage de boue et de fumier, les eaux usées domestiques et les formations géologiques contenant des composés azotés solubles (Santé Canada 1987). Cependant, ces sources peuvent être classées selon leurs origines naturelle et anthropique.

#### 2.1.3.1 Sources naturelles (cycle de l'azote)

Parmi les sources naturelles de nitrates, on peut citer les sources d'azote organique, les bactéries fixatrices de l'azote (exemples : bactéries symbiotiques du genre *Rhizobia* et bactéries asymbiotiques des genres *azobacter* et *Clostridium*) et dans une moindre mesure l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>). Toutes ces sources constituent des précurseurs du cycle naturel de l'azote dont le nitrate est un métabolite important. Ce dernier est produit suite à la nitrification des autres formes azotées contenues dans ces précurseurs. Ainsi, dans le cycle de l'azote, la fraction organique de l'azote [-CNH<sub>3</sub>-] et l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) qui sont présents au niveau du sol sont préalablement dégradés par l'action des microorganismes (des plantes, du sol, de l'eau) en ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Pour ce qui est du N<sub>2</sub>, cette conversion peut aussi se faire dans une moindre mesure par les décharges électriques comme la foudre. L'ammonium issu de cette conversion initiale sera à son tour successivement oxydé en nitrites, puis nitrates toujours par action microbienne et dans les conditions aérobiques qui règnent à la surface du sol (OMS 2004). Ces processus peuvent se résumer comme suit :



En somme, on peut dire que le nitrate naturel provient principalement de la minéralisation de la matière organique présente au niveau du sol. Tout ceci explique

qu'il soit un constituant et métabolite normal de la biosphère, dont la végétation et les mammifères qui la consomment.

Pour ce qui est du nitrite, c'est un intermédiaire à la fois des processus de nitrification et de dénitrification du cycle de l'azote. C'est aussi un métabolite normal chez les mammifères (IPCS 1999). Il peut aussi être formé suite à la réduction enzymatique du nitrate par les bactéries possédant des nitroréductases. Chez l'humain, on retrouve normalement ces bactéries dans la partie inférieure du tube digestif (petit intestin). Cependant, chez les individus souffrant d'hypochlorhydrie ou chez les nourrissons (ayant une faible acidité gastrique), elles peuvent aussi envahir la partie supérieure du tube digestif. En outre, la conversion des nitrates en nitrites peut aussi subvenir lors de l'entreposage des végétaux tels que les épinards (Montesano et Bartsch 1976).

### **2.1.3.2 Sources anthropiques**

Les engrais épandus sur le sol lors d'activités agricoles et d'élevage intenses constituent les sources majeures de nitrates dans l'environnement (OMS 2004; Fields 2004). Actuellement, ils sont considérés comme étant les sources majeures de nitrates dans l'eau. Cependant, les niveaux de nitrates peuvent aussi être augmentés dans les eaux de consommation lorsque la chloramination fait partie du processus de traitement (McGuire et al. 1999; Weyer et al. 2006). En outre, le nitrate formé dans l'air suite à la photolyse des oxydes d'azote ( $\text{NO}_x$ ) contenus dans les émissions industrielles et d'automobiles constitue aussi une source anthropique de nitrates (Ward et al. 2007).

Étant donné que les nitrites sont utilisés comme agent de conservation des aliments dont les viandes, ces dernières peuvent en constituer des sources directes (IPCS 1999). Par ailleurs, les nitrites peuvent aussi provenir d'un excès d'ammoniaque dans les réseaux de distribution d'eau potable. C'est le cas lorsqu'il s'en forme *in situ* à partir de chlore et d'ammoniaque, ou lorsque les chloramines sont utilisées comme désinfectant (OMS 2004; McGuire et al. 1999; Weyer et al. 2006), ou encore lors de la réduction bactérienne du nitrate contenu dans des eaux peu oxygénées.

#### 2.1.4 Devenir environnemental

Les nitrates sont des éléments essentiels pour la croissance des plantes. C'est justement sous forme nitrates qu'elles prélèvent du sol l'azote utilisé pour effectuer leur synthèse protéique (azote organique – [-CNH<sub>3</sub>-]). Le surplus de nitrates au niveau du sol est par la suite mobilisé vers la nappe phréatique lors de l'infiltration des eaux.

Parce que la plupart des sources de nitrates se retrouvent à la surface ou dans la colonne du sol, les aquifères peu profonds (<100 pieds de profondeur) sont généralement considérés comme étant plus susceptibles à la contamination que les aquifères plus profonds (Madison et Brunett 1985). Ainsi, les nitrates atteindront les aquifères peu profonds en grande quantités en conditions aérobiques vu que le taux de dénitrification y est faible, faisant ainsi des eaux souterraines les sources d'eau potable généralement les plus polluées. Ceci n'est pas le cas dans les aquifères très profonds qui sont des milieux réducteurs compte tenu des conditions anaérobiques qui y règnent. Ainsi, dans ce type d'aquifères, les nitrates pourront être dénitrifiés presque complètement en azote par action microbienne (exemple des bactéries *Pseudomonas*) (Gélinas et al. 2004). Malgré tout, ces nappes très profondes peuvent être souvent contaminées. C'est le cas lorsqu'en plus de connections hydrauliques entre les deux niveaux d'aquifères, qu'il existe un gradient hydraulique descendant qui puisse permettre la migration en fonction du temps des nitrates contaminants vers les profondeurs (Madison et Brunett 1985).

En somme, la profondeur de la nappe souterraine, le taux de précipitations, la présence d'autres matières organiques, les types de sols et leur conductivité hydraulique, les propriétés physico-chimiques du sol sont tous des déterminants du devenir des nitrates dans le sol (Madison et Brunett 1985; OMS 2004).

L'occurrence de la nitrification et de la dénitrification dans les eaux de surface dépend de leurs températures et pH. Cependant, le prélèvement par les plantes reste la cause principale de la baisse des niveaux de nitrates dans les eaux de surface.

Pour ce qui est des nitrates de l'air, ceux-ci sont rapidement convertis en acide nitrique (pluies acides) et en particules d'aérosols inorganiques. Ces derniers sont efficacement épurés par des dépôts humide ou sec (NIPHEP 1989).

## **2.2 Nitrates (N° CAS 14797-55-8)**

### **2.2.1 Exposition**

L'exposition humaine aux nitrates est principalement due à l'exposition exogène (ingestion d'aliments et d'eau potable) et à la synthèse endogène. La contribution de chaque source est hautement variable, les aliments constituant la source la plus importante de l'exposition exogène.

#### **2.2.1.1 Alimentation**

Le nitrate est un constituant normal de la diète typique. Celle-ci constitue la source d'exposition principale à cette substance lorsque ses concentrations dans l'eau sont faibles. Les sources alimentaires de nitrates incluent entre autres les légumes, les produits de viande (saumurés), les produits céréaliers (boulangerie), et dans une moindre mesure les poissons et les produits laitiers (fromages) (Grosse et al. 2006). De toutes ces sources, les légumes constituent les plus importantes. Les niveaux sont très variés en fonction des légumes et l'on compte parmi les plus concentrés : la laitue, la betterave, les épinards (environ 4259 mg/kg) et les légumes racines (environ 5150 mg/kg) (Chung et al. 2003). Ces niveaux peuvent aussi être affectés par la façon de les apprêter (le mode de cuisson entre autres), l'utilisation de fertilisants, les conditions de culture dont particulièrement la température du sol et l'intensité de l'ensoleillement (Gangolli et al. 1994). Bien que les légumes aient rarement été indexés dans les cas de toxicité aiguë, leur contribution à l'apport de nitrates par une diète typique est estimée varier de 85 à 90% (Chung et al. 2003; Santé Canada 1987; Gangolli et al. 1994; Vermeer et van Maanen 2001; Walker 1990). Le reste de l'apport provient essentiellement des viandes et du fromage dans lesquels le nitrate de potassium (ou de sodium) est souvent utilisé pour la salaison ou comme agent de conservation et colorant (ATSDR 2007). Au Canada, sa concentration dans les salaisons, de même que celle des nitrites, a diminué du fait de la réglementation concernant ces additifs alimentaires. Pourtant aux États-Unis, on estime la contribution des salaisons à environ 10% de l'apport alimentaire de nitrates et de nitrites (Santé Canada 1987). Soulignons que l'apport en nitrates varie aussi en fonction du régime alimentaire : végétarien ou standard.



Au Canada, l'apport quotidien total (AQT) en nitrates a été estimé à 44,3 mg/jour (soit 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Santé Canada 1987). Cette valeur se situe dans la partie inférieure de l'étendue estimative de l'Organisation mondiale de la santé (43 à 131 mg/jour) et de l'Environmental Protection Agency des États-Unis (40 à 100 mg/jour). En Europe, il est estimé à environ 50-140 mg/jour (OMS 2007; ATSDR 2007; OEHHA 1997). Cependant, cet AQT peut être beaucoup plus élevé chez les végétariens ou dans le cadre d'une alimentation riche en nitrates, cas dans lesquels des niveaux variant de 39 à 268 mg/jour ont été rapportés dans les urines (OMS 2007). À l'inverse, il peut aussi être diminué lorsque les niveaux de nitrates dans l'eau augmentent. C'est justement pour cette raison qu'il a été estimé à 33 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (soit 146 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pour les populations rurales québécoises (INSPQ 2003; Levallois et al. 2000; Phaneuf et al. 2004).

### 2.2.1.2 Eau <sup>2</sup>

Les niveaux de nitrates sont faibles dans les eaux de surface. Même s'ils varient habituellement entre 0,1 et 5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, ils sont en général inférieurs à 1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (OMS 2007). Ces niveaux dépendent des saisons et varient habituellement de moins de 0,5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L l'été à 5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et plus l'hiver (NIPHEP 1989). Les niveaux pourraient cependant augmenter lorsque le cours d'eau est alimenté par un aquifère riche en nitrates.

Les concentrations sont généralement plus élevées dans les eaux souterraines de puits peu profonds d'où elles varient normalement de 0,1 à 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Santé Canada 1987). Toutefois, lorsque ces niveaux sont compris entre 3,1 et 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, il y a lieu de soupçonner l'influence d'activités anthropiques sur la nappe phréatique (Madison et Brunett 1985). Il a justement été démontré que les puits peu profonds situés dans des régions ayant un pool important d'azote (et dont les sols sont bien drainés et constitués de roches non consolidés) étaient plus susceptibles d'avoir des niveaux élevés de nitrates (Nolan et al. 2002). En outre, les niveaux sont encore plus élevés dans les puits individuels car ceux-ci ne sont pas réglementés comme

---

<sup>2</sup> Les concentrations de nitrates et de nitrites dans l'eau sont souvent exprimées dans la littérature en poids d'azote de nitrate « N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> » et poids d'azote de nitrite « N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ». Les équivalents sont les suivants : 1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L = 4,43 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et 1 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L = 3,29 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Santé Canada 1987).

les puits publics. D'ailleurs, la plupart des cas de toxicité universellement rapportés sont le plus souvent associés à l'ingestion d'eaux de puits privés dont les niveaux dépassent parfois 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et plus (OMS 2007).

Au Canada, les concentrations de nitrates dans les eaux municipales sont généralement inférieures à 5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Santé Canada 1987). Les concentrations de nitrates et de nitrites dans les réseaux d'eau potable du Québec sont, dans la très grande majorité des cas, très faible. Ainsi, des niveaux de ces substances supérieures à 3 mg N/L ont été observés seulement dans 4,3 % des prélèvements réalisés entre 1995 et 2000 dans les réseaux surveillés dans le cadre du *Règlement sur la qualité de l'eau potable* (INSPQ 2003).

Aux États-Unis (ÉU) (Californie), les niveaux de cette substance dans l'eau souterraine sont en général inférieurs à 2 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Les nitrites eux, sont généralement négligeables (Mueller et Helsel 1996). Des niveaux dépassant 20 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L ont été rapportés pour environ 3% des eaux de surface et 6% des eaux souterraines (OMS 2007).

Cependant, comme conséquence des activités agricoles, les concentrations de nitrates peuvent facilement augmenter. C'est le cas d'une région agricole de l'Inde où des niveaux atteignant 1500 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L ont été mesurés dans l'eau souterraine (OMS 2007).

### 2.2.1.3 Air

Étant donné que le nitrate n'est pas volatil, ses niveaux dans l'air sont négligeables. Par conséquent, son apport *via* l'air est généralement considéré négligeable comparé aux apports alimentaires et hydriques. Ainsi, des concentrations atmosphériques variant de 0,1 à 0,4 µg/m<sup>3</sup> ont été rapportées, les plus faibles étant dans le Pacifique Sud. Des concentrations très élevées variant de 1 à 40 µg/m<sup>3</sup> ont aussi été rapportées avec des moyennes annuelles de 1 à 8 µg/m<sup>3</sup> (OMS 2007). Bien qu'on sache très peu sur l'occurrence du nitrate dans l'air intérieur, un lien avec l'utilisation domestique d'aérosols a été démontré. Pour ce qui est de l'air extérieur, les moyennes de ses concentrations dans les aérosols sont d'environ 3,2 µg/m<sup>3</sup> et comme acide nitrique d'environ 0,9 µg/m<sup>3</sup>. En été les concentrations sont 1,5 fois environ plus élevées que

celles mesurées durant l'hiver (NIPHEP 1989). En 1990 au Canada, la moyenne annuelle des concentrations de nitrates dans l'air ambiant était de  $0,88 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dans 34 localités où avaient été installées 50 stations d'échantillonnage (Santé Canada 1987). L'apport quotidien de nitrates par inhalation avait alors été estimé à environ  $18 \mu\text{g}/\text{jour}$  pour un adulte (volume respiratoire quotidien de  $20 \text{ m}^3$ ) et  $1,8 \mu\text{g}$  chez un nourrisson (volume respiratoire quotidien de  $2 \text{ m}^3$ ). Aux États-Unis les apports sont plus élevés et ont été estimés varier de 25 à  $70 \mu\text{g}/\text{jour}$  pour un adulte (Santé Canada 1987).

#### **2.2.1.4 Estimation de l'exposition exogène totale et contribution relative de l'eau potable à l'apport**

La plus grande contribution à l'apport quotidien total (AQT) en nitrates provient des aliments, suivie de l'eau. Cette dernière contribue en général pour moins de 14% de l'AQT. La contribution de l'air est considérée négligeable (OMS 2004, 2007; Santé Canada 1987). Ainsi, au Canada, Santé Canada estime l'AQT de nitrates pour un adulte à  $51 \text{ mg}/\text{jour}$ , soit  $44,3 \text{ mg}$  provenant des aliments (87% de l'apport) et  $6,8 \text{ mg}$  de l'eau potable (13% de l'apport) lorsque celle-ci a une concentration moyenne de  $4,5 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$ . Cependant, lorsque l'eau est fortement contaminée, son apport peut considérablement augmenter, atteignant même 50% après ingestion de  $1,5 \text{ L}$  d'une eau à  $30 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$ , l'AQT étant alors passé de 51 à  $99 \text{ mg}/\text{jour}$  (Santé Canada 1987).

Aux ÉU, l'apport de l'eau est encore plus faible (2 à 3% de l'AQT). En effet, pour plus de 99% de la population, seulement 1 à 3% des nitrates proviennent de l'eau. La contribution de cette dernière à l'exposition totale de nitrates devient importante seulement dans les zones où la contamination de l'eau est notable (OEHHA 1997).

Pour ce qui est des nourrissons, l'eau utilisée pour la préparation des laits maternisés est généralement la principale source de nitrates. Ainsi pour des nourrissons de 3 à 5 kg, une consommation moyenne de  $0,6 \text{ L}/\text{jour}$  d'eau ayant une concentration moyenne de  $4,5 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$  (préparations et boissons comprises), les exposerait à  $0,7 \text{ mg}/\text{kg}/\text{jour}$  en moyenne. Cependant, si l'eau contenait plutôt  $50 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$ , cette

exposition pourrait atteindre 8 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg/jour (OMS 2004; OMS 2007; Santé Canada 1987). Soulignons que cet apport varie en fonction du régime alimentaire des nourrissons et pourrait être très élevé chez ceux dont des légumes sont introduits très tôt dans le régime alimentaire. Pour ce qui est des enfants essentiellement nourris au sein, l'apport en nitrates est considéré négligeable (OEHHA 1997); la quantité de nitrates mesurée dans le lait humain ayant été estimée à environ 0,32 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L seulement (INSPQ 2003).

### 2.2.1.5 Synthèse endogène

Il existe une synthèse endogène de nitrates, estimée en moyenne à environ 1 mmol/jour ou encore 62 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/jour (=14 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/jour), soit 1 mg/kg/jour pour un adulte en santé d'environ 60 kg (OMS 2004, 2007; Santé Canada 1987; Tannenbaum et al. 1991). En effet, des études ont démontré que l'excrétion urinaire de nitrates augmente considérablement lors d'inflammations et d'infections gastro-intestinales dont particulièrement la diarrhée (Gangolli et al. 1994; INSPQ 2003; OMS 2004). Ainsi, lors de leur hospitalisation pour cause de diarrhées sévères, des concentrations anormalement élevées de nitrates urinaires ont été mesurées chez des enfants soumis à une diète stricte en nitrates (0,5 – 1,6 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/jour) (INSPQ 2003; Phaneuf et al. 2004).

Parallèlement, des études chez des animaux auxquels on a induit des infections et des réactions inflammatoires appuient l'existence de cette synthèse endogène. En outre, elles soutiennent aussi le fait que cette synthèse soit probablement induite par l'activation du système réticuloendothélial mammalien : la voie L-arginine-NO-synthase (L-Arg-NOS). Bien que cette voie ait été difficilement mise en évidence chez l'humain contrairement à l'animal, l'administration d'arginine radioactive ([<sup>15</sup>N]Arg) à deux volontaires a résulté en l'incorporation de l'azote radioactif <sup>15</sup>N dans le nitrate urinaire des deux individus, confirmant ainsi l'hypothèse de la synthèse par la voie L-Arg-NOS chez l'humain (OMS 2004, 2007).

Actuellement, il est reconnu que la voie majeure de synthèse endogène des nitrates chez les mammifères est la voie L-Arg-NOS (Tannenbaum et al. 1991; IARC 1998). Elle est constitutive dans la majorité des cellules du corps. D'après cette voie, l'acide aminé L-Arginine est converti en NO et 1-citrulline par l'enzyme NOS. Le NO est oxydé par la suite en anhydre nitreux (Vermeer et van Maanen 2001). La réaction de ce dernier avec

l'eau est à l'origine de la formation du nitrite, lequel est rapidement oxydé en nitrate par l'hémoglobine (OMS 2004, 2007). Le NO a pour principal rôle de moduler les fonctions neuromusculaires (neurotransmetteur) et vasculaires (vasodilatateur) (Mirvish 1995). Ainsi, dans les conditions normales, le NO plasmatique provient essentiellement de cette voie constitutive qui assure le niveau basal de nitrate. Cependant, lors d'inflammations ou autres infections, les cellules blanches du sang (macrophages) expriment une NOS inductible (iNOS) qui produit de grandes quantités de NO et par conséquent augmente les concentrations de nitrates plasmatiques (Iijima et al. 2002; Lundberg et al. 2004). Ceci explique donc les niveaux urinaires élevés observés lors d'infections. Par ailleurs, à des concentrations très élevées, le NO peut réagir rapidement avec l'oxygène pour former l'espèce nitrosante  $N_2O_3$ .

### **2.2.2 Pharmacocinétique et biotransformation**

Chez l'Homme, nitrate et nitrite participent à un échange dynamique dans ce que l'on peut appeler « cycle interne de l'azote ». Ce dernier comprend l'ingestion, la synthèse endogène et l'excrétion qui se fait principalement sous forme nitrates dans l'urine.

Suite à leur ingestion, les nitrates sont rapidement absorbés au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle (OMS 2004). Les aliments riches en pectine retarderaient cette absorption qui aurait alors lieu plus bas dans l'intestin, avec la possibilité de transformation microbienne des nitrates en nitrites (IPCS 1999). Une fois dans le sang les nitrates absorbés se mêlent au nitrate endogène. Après une distribution rapide dans les tissus, ils sont activement sécrétés dans la bouche. Ainsi, le nitrate plasmatique serait concentré dans la salive par les glandes salivaires *via* un système de transport actif qui compétitionne avec ceux de l'iode et du thiocyanate (OMS 2004). Ce sont environ 25% des nitrates absorbés qui sont sécrétés et concentrés par un facteur de 10 (Duncan et al. 1995; Mirvish 1994) dans la salive grâce à une pompe active. Par la suite, la microflore buccale se chargerait de transformer environ 20% des nitrates sécrétés dans la bouche en nitrites qui se retrouvent alors dans la salive (OMS 2007). En définitive, seront réduits en nitrites environ 5% des nitrates absorbés (ATSDR 2007; Granli et al. 1989; IARC 1998; INSPQ 2003; Mirvish 1994). Cette réduction a été démontrée *in vivo* et *in vitro* à

la fois dans les systèmes métaboliques bactériens et mammaliens, *via* les nitrates réductases ubiquitaires (OMS 2004). Bien que le site majeur de cette réduction soit la bouche, elle peut aussi survenir dans l'estomac lorsque le pH de celui-ci devient anormalement élevé pour quelques raisons que ce soit : utilisation d'antiacide, pathologies (hypochlorhydrie, achlorhydrie, ...) (ATSDR 2007; INSPQ 2003). La réduction peut aussi survenir au niveau des voies urinaires et vaginales lorsque celles-ci sont infectées (Gangolli et al. 1994; INSPQ 2003). Une fois les nitrites formés dans la bouche, le mélange nitrates/nitrites atteint le tronçon gastro-intestinal par le moyen de la salive. À ce niveau, ils sont absorbés au niveau de la partie proximale de l'intestin et atteignent la circulation générale d'où les nitrites sont oxydés en nitrates par l'hémoglobine et tous les nitrates entrent de nouveau dans la circulation pour un autre cycle. Chez l'humain, on observe des pics de concentrations plasmatiques de nitrates environ 60 minutes après leur ingestion. Les fluides corporels (sérum, salive, urines, suc gastrique, sueur, fluide iléostomique) eux, atteignent des concentrations maximales 1 à 3 heures après l'ingestion (Phaneuf et al. 2004).

La voie métabolique majeure des nitrates est leur conversion en nitrites, puis en ammonium (ATSDR 2007). Ainsi, de manière générale, la majorité des nitrates ingérés sera éventuellement excrétée dans les urines sous forme nitrates, ammonium ou urée; l'excrétion fécale est considérée négligeable (OMS 2007). Leur demi-vie d'élimination est estimée à environ 5 heures (IPCS 1999; OMS 2004; Gangolli et al. 1994; INSPQ 2003; Walker 1990).

Chez les nourrissons, 80 à 100% des nitrates absorbés sont excrétés dans l'urine dans les 24 h (INSPQ 2003; Turek et al. 1980). Chez l'adulte, ce sont plutôt 65 à 70% de ceux-ci qui sont excrétés dans les urines en 24 heures (IPCS 1999; ATSDR 2007; INSPQ 2003; Bartholomew and Hill 1984). Le reste le serait dans la sueur (10%), les larmes, les sécrétions vaginales et coliques. Aucune accumulation dans les glandes mammaires ou le lait n'a été rapportée aussi bien chez l'animal que l'humain (IPCS 1999; INSPQ 2003; Turek et al. 1980).

## 2.3 Nitrites (N° CAS 14797-65-0)

### 2.3.1 Exposition

#### 2.3.1.1 Alimentation

Les contributeurs majeurs à l'exposition aux nitrites alimentaires sont les produits de viandes, les produits céréaliers (boulangerie), les légumes (betteraves, maïs, épinards, feuilles de navet) et les fruits (Jakszyn et al. 2006). Les niveaux sont en général très faibles dans les aliments (de 2,0 à 4,0 mg/kg) (Vermeer et van Maanen 2001). C'est le cas particulier des végétaux qui en général ont des teneurs < 1mg/kg. En plus de cela, les niveaux ne sont pas significativement différents entre la plupart des légumes (Chung et al. 2003). Ces niveaux peuvent malgré tout, beaucoup augmenter lorsque les légumes sont avariés ou mal conservés. Des niveaux atteignant 400 mg/kg ont justement été rapportés dans de pareils cas (OMS 2007).

Les sources majeures de nitrites sont les produits de viandes qui seraient responsables d'environ 70% de l'apport en nitrites alimentaires, dépendamment des quantités de viandes consommées, de leurs origines et types. Cependant, depuis la découverte de la formation possible des NOC dans les aliments, l'ajout des nitrites dans ceux-ci a beaucoup diminué (Dietrich et al. 2005). Au Canada par exemple, sa concentration dans les aliments a diminué du fait de la réglementation concernant les additifs alimentaires. En effet, compte tenu de cette possibilité de formation de nitrosamines cancérigènes, la quantité maximale de nitrate ou de nitrite qui peut être ajoutée est limitée à 200 ppm (Santé Canada 2004a; ACIA 2006). C'est donc sur cette base que Santé Canada a évalué l'apport quotidien moyen en nitrites alimentaires au Canada à 0,5 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/jour (soit 0,15 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Santé Canada 1987; Phaneuf et al. 2004). Aux ÉU où les salaisons représentent environ 10% de l'apport alimentaire de nitrate et de nitrite, on l'estime plutôt entre 0,3 et 2,6 mg/jour (OMS 2007; OEHHA 1997). En Europe, il varie de moins de 0,1 à 8,7 mg/jour compte tenu des diètes européennes (OMS 2007). Jakszyn et al. (2006) ont d'ailleurs rapporté des valeurs similaires dans leur étude réalisée en Espagne : de 0,8 à 5,3 mg/jour avec une moyenne géométrique de 0,994 mg/jour.

### **2.3.1.2 Eau**

Les nitrates étant la forme la plus stable des substances azotées, toutes les autres formes azotées y compris les nitrites, auront donc tendance à se transformer en nitrates. C'est donc pour cette raison que les nitrites sont généralement retrouvés sous forme de traces dans l'eau naturelle non contaminée. Cependant, dans les cas de contaminations bactériennes ou de traitement de l'eau par chloramination, une nitrification peut être favorisée et entraîner l'augmentation des concentrations de nitrites dans l'eau tout au long du système de distribution. Ainsi la nitrification qui a lieu dans les systèmes de distribution d'eau chloraminée est généralement responsable d'une augmentation des niveaux de nitrites de l'ordre de 0,2 à 1,5 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L et ce jusqu'à des maximums de plus de 3 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (OMS 2007).

### **2.3.1.3 Air**

Pas de données rapportées, sans doute pour les mêmes raisons évoquées dans le cas de l'eau.

### **2.3.1.4 Synthèse endogène**

La formation endogène de nitrite, comparée à son apport alimentaire, contribue beaucoup plus à son exposition totale (plus de 90%) (Gangolli et al. 1994; Mirvish 1994; Bos et al. 1988). Plus précisément le nitrite salivaire, provenant de la réduction bactérienne des nitrates sécrétés dans la bouche, constitue la source majeure de l'exposition totale aux nitrites chez l'humain (Iijima et al. 2002; Combet et al. 2007; Eisenbrand et al. 1980), mais surtout du nitrite gastrique (chez un individu en santé) qui est l'un des précurseurs des NOC. Les bactéries qui colonisent la région dorsale de la langue convertissent en moyenne 5% des nitrates en nitrites (McColl 2007). On estime que cette transformation des nitrates serait responsable de 70 à 80% de l'exposition totale aux nitrites (Bos et al. 1988). Il a été estimé qu'approximativement 3,5 mg de nitrites endogènes seraient formés chaque jour chez un américain moyen (IPCS 1999). Cette formation ne semble pas être influencée par la constitution de la diète (Spiegelhalder et al. 1976), mais cependant, dépendrait de plusieurs facteurs (ex. taux



d'ingestion de nitrates; variation interindividuelle) (IPCS 1999). Ainsi, la production de nitrites augmente avec l'âge (Turek et al. 1980) et est stimulée par les infections bactériennes provoquant la diarrhée (Santé Canada 1987). Le nitrate peut aussi être réduit en nitrite dans l'estomac si le pH y est suffisamment élevé ( $\text{pH} > 5$ ) pour permettre la croissance bactérienne (IPCS 1999). C'est le cas chez les adultes atteints de pathologies gastriques telles que l'atrophie gastrique (achlorhydrie). C'est aussi le cas chez les nourrissons dont le pH gastrique est normalement élevé. C'est d'ailleurs pour cette raison que les nourrissons de moins de 3 mois sont considérés comme étant le principal groupe cible du risque de méthémoglobinémie (U.S.EPA 2002a).

### **2.3.2 Pharmacocinétique et biotransformation**

Dans l'organisme, nitrates et nitrites participent à un inter-échange dynamique : le cycle humain de l'azote. Après que les nitrites soient formés par la transformation bactérienne des nitrates, le mélange nitrates/nitrites entre dans le tractus gastro-intestinal *via* la salive. Il n'existe malheureusement pas d'informations concernant l'absorption des nitrites chez l'humain. Cependant, la formation de méthémoglobinémie chez les nourrissons laisse croire qu'ils seraient absorbés. De plus, d'après des études faites chez des rongeurs (rat et souris), ceux-ci seraient absorbés au niveau gastrique et intestinal (OMS 2004; INSPQ 2003). Bien que leur distribution soit mal connue, une fois dans le sang, les nitrites sont oxydés par l'hémoglobine en nitrates avec la formation de méthémoglobine (metHb) (IPCS 1999; OMS 2007; IARC 1998; McColl 2007). Les nitrites sont facilement transformés en espèces nitrosantes en environnement acide (particulièrement l'estomac). Ces dernières peuvent réagir avec une panoplie de composés : soit l'acide ascorbique, soit les amines et les amides pour former les composés N-nitrosés (OMS 2007; Vermeer et van Maanen 2001). Le nitrite est peu ou faiblement excrété sous forme inchangée (OMS 2007, 2004).

Tout comme les nitrates, les nitrites ne s'accumulent pas dans les glandes mammaires ou le lait (Fan et al. 1987). Ils traversent toutefois la barrière placentaire et entraînent la formation de metHb fœtale chez le rat (OMS 2007; INSPQ 2003).

### **2.3.3 Taux de transformation des nitrates en nitrites**

Chez les rongeurs, la sécrétion active et la réduction des nitrates en nitrites sont virtuellement absentes. Pour cette raison, on pense que la réduction totale des nitrates chez ces espèces serait probablement inférieure à celle des humains (OMS 2007, 2004). Ceci explique pourquoi ces espèces ne sont pas utilisées pour estimer le taux de transformation des nitrates en nitrites (NIPHEP 1989).

La conversion des nitrates en nitrites est dans une grande mesure le fait des bactéries qui logent le tractus buco-gastro-intestinal. Conséquemment, le taux de transformation des nitrates suite à leur ingestion ne dépendra pas seulement de la dose de nitrates ingérés, mais aussi de la quantité et du type de bactéries qui y résident.

Environ 5 à 10% des nitrates absorbés sont convertis en nitrites dans la salive, l'estomac et le petit intestin (ATSDR 2007).

Les niveaux de nitrites varient beaucoup plus que ceux des nitrates. En plus des variations journalières (niveaux plus élevés la nuit que le jour), Siddiqi et al. (1992) ont rapporté que les niveaux de nitrites variaient aussi en fonction de l'âge : plus élevé chez les personnes âgées par rapport aux individus plus jeunes. Ainsi, ces mêmes auteurs ont rapporté des augmentations des taux de nitrites totaux variant de 30,7 à 40% en fonction de l'âge. Ces augmentations semblaient refléter l'augmentation relative de la flore buccale. Des taux de transformation pouvant atteindre 30% ont aussi été rapportés par d'autres auteurs (McColl 2007). Les niveaux de nitrate/nitrite dépendent aussi des variations interindividuelles telles que le débit de salive (Eisenbrand et al. 1980), le métabolisme hydrique et l'hygiène buccale. Pour simple comparaison, les proportions calculées de nitrite par rapport au total nitrate/nitrite dans des populations égyptienne et allemande étaient de 25,2 et 17,4% respectivement (Siddiqi et al. 1992).

## **2.4 Composés N-nitrosés**

Le nitrate en lui-même n'est pas une substance dangereuse et il n'existe pas de preuves scientifiques suggérant des effets toxiques associés aux nitrates. En fait, leur toxicité est due à leur transformation en nitrites avant ou après leur ingestion, suivie soit

de la formation de méthémoglobine ou alors de la synthèse endogène de composés N-nitrosés. Composés N-nitrosés (NOC).

#### 2.4.1 Origine et propriétés physico-chimiques

Les composés N-nitrosés constituent une très grande famille de substances dont l'une des caractéristiques est la présence d'un groupement nitro (-N=O) lié à un atome d'azote contenu dans la substance. Ils proviennent essentiellement de l'attaque nucléophile de l'atome d'azote de certaines substances nitrosables (amines et amides) par les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>). On parle alors de réaction de nitrosation. Sur le plan structural, il existe deux groupes principaux de NOC dont la structure générale est : (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>)-N-N=O. Dans le premier groupe qui est celui des N-nitrosamines (= nitrosamines), les radicaux R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> peuvent être soit des groupements alkyls, soit des groupements aryles, lesquels peuvent être identiques (diakyl, diaryl), différents (alkaryl ou amines secondaires cycliques) ou alors, faire tous partie d'un cycle. Dans le second groupe des N-nitrosamides (= nitrosamides) l'un des radicaux R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> est un groupement alkyl ou aryle et l'autre un groupement acyle (N-alkylurées, N-alkylcarbammates et des simples N-alkylamides) (Foster et al. 1981; Mirvish 1975).

Les propriétés physiques des NOC varient beaucoup en fonction de leurs groupements. Typiquement les nitrosamines peuvent être liquides, lipides ou volatiles. Ce sont des composés qui en général sont chimiquement stables (même dans les conditions physiologiques) et se décomposent lentement à la lumière ou en solutions aqueuses acides (Brown 1999).

C'est le cas contraire pour les nitrosamides qui sont très instables dans les solvants aqueux, en milieu neutre et basique, et même au pH physiologique. En milieu acide, elles se décomposent pour donner des quantités importantes de nitrites (Mirvish 1975). Normalement formées en milieu acide, leur synthèse est catalysée *in vitro* par les citrates et d'autres acides organiques (Gangolli et al. 1994; Dietrich et al. 2005; Mirvish 1971). Ce sont des substances thermodynamiquement instables qui se décomposent à des températures de plus de 100° C, sous la lumière normale et la lumière UV (Dietrich et al. 2005). Elles se transforment en intermédiaires réactifs (alkylant) par décomposition non

enzymatique. De par leur instabilité, les nitrosamides sont moins susceptibles d'être retrouvées dans l'alimentation générale, même si leurs précurseurs le sont (Dietrich et al. 2005; Mirvish 1971).

Les nitrosamines montrent des pics d'absorption UV dans l'eau à 230-240 nm et 330-350 nm. Les nitrosamides quant à elles ont des pics d'absorption dans l'eau aux longueurs d'onde 390-420 nm.

On pourrait aussi catégoriser les NOC en NOC préformés (ou exogènes) et NOC endogènes. Ces derniers proviendraient principalement de la nitrosation de substances nitrosables dans l'organisme dont l'estomac en est le site majeur. Ainsi, après que les nitrites issus de la transformation bactérienne des nitrates entrent dans l'estomac *via* le mélange salivaire (nitrates + nitrites), deux issues possibles existent. D'une part, ils peuvent être absorbés dans la circulation sanguine d'où ils induiront la formation de méthémoglobine. D'autre part, en présence de substances nitrosables, ils pourront induire dans le milieu acide de l'estomac la formation de NOC endogènes (ENOC).

Par ailleurs, la réaction de nitrosation peut aussi avoir lieu hors de l'organisme et les NOC qui en sont issus sont dits « préformés ». Le nitrite et les NO<sub>x</sub> peuvent aussi réagir avec les amines et les amides dans les solvants inorganiques ou les lipides dans lesquels ils sont solubles pour former les NOC. Outre le fait qu'ils soient très solubles dans les lipides, les NO<sub>x</sub> se retrouvent aussi dans l'air pollué et la fumée de cigarette. Ce dernier cas explique pourquoi les NOC exogènes sont majoritairement retrouvés dans les produits de tabac (Mirvish 1986).

#### **2.4.2 Exposition humaine**

L'exposition humaine peut être exogène (NOC préformés) ou endogène (NOC endogènes). L'exposition aux NOC préformés se fait principalement *via* des sources diététiques ou non. Parmi les sources non diététiques, nous pouvons citer entre autres: le tabac et ses produits (la fumée de tabac), les cosmétiques, les médicaments, les produits chimiques pour l'agriculture, l'eau (systèmes de distribution utilisant le chlore ou les chloramines) et l'exposition professionnelle (caoutchouc, cuir, industrie du métal). De tous ceux-ci, le tabac contribue majoritairement à l'exposition. Il constitue en effet la

source principale des nitrosamines cancérigènes NNN (N-nitrosornicotine) et NNK (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), dont les concentrations en sont relativement élevées. Ainsi, fumer 20 cigarettes/jour résulterait en une exposition aux NOC de 3,4 µg/jour (avec des maximums rapportés de 48 µg/jour chez les fumeurs lourds). Pire encore, l'aspiration directe par le nez sous forme de poudre engendrerait jusqu'à 27,5 µg/jour (avec des maximums rapportés de 700 µg/jour) (Vermeer et van Maanen 2001).

Dans la diète, les NOC sont retrouvés sous forme de traces (Vermeer et van Maanen 2001; Eisenbrand et al. 1980). Ils sont principalement présents dans le malt (lors de la production de bière et de whisky), le fromage, les aliments salés ou saumurés (les viandes préservées et leurs dérivés, les poissons en conserves, les aliments préservés par la fumée). Soulignons que les concentrations de NOC dans les produits salés ou saumurés ont beaucoup diminué du fait de la diminution des concentrations de nitrates et de nitrites utilisés comme agents conservateurs et aussi de l'ajout de vitamine C comme antioxydant.

Finalement, l'exposition endogène qui se fait typiquement après l'ingestion de nitrates/nitrites contribuerait pour environ 45-75% de l'exposition totale aux NOC (Jakszyn et Gonzalez 2006; Tricker 1997).

### **2.4.3 Toxicité et cancérigénicité**

De nos jours, environ 300 NOC ont été testés chez les animaux expérimentaux pour évaluer leur cancérigénicité. De ceux-ci, environ 85% des 209 nitrosamines et 92% des 86 nitrosamides se sont révélés être cancérigènes pour une panoplie (environ 39) d'espèces de poissons, de reptiles, d'amphibiens, d'oiseaux, de rats, de souris, de hamsters et de mammifères incluant 5 espèces de primates (Gangolli et al. 1994; Vermeer et van Maanen 2001; Montesano et Bartsch 1976; Brown 1999).

Les nitrosamides, cancérigènes puissants, sont des agents alkylants directs qui agissent directement sur leur site de formation ou d'application. C'est pourquoi elles sont capables de former des adduits avec l'ADN sur leur site de formation (Vermeer et van Maanen 2001)

Les nitrosamines quant à elles, exercent leur pouvoir cancérigène suite à une activation métabolique prônée par les Oxydases à Fonction Mixte (MFO) microsomales (Gangolli et al. 1994; Mirvish 1995). Leur action se fait donc essentiellement *via* la formation d'intermédiaires réactifs qui agissent avec les groupes nucléophiles des macromolécules cellulaires (DNA, RNA et protéines) (Montesano et Bartsch 1976). De façon générale, l'effet cancérigène des nitrosamines est organo- spécifique. En plus de cette spécificité, le site d'action des nitrosamines est grandement influencé par la structure chimique de ses radicaux : la longueur de la chaîne alkyl par exemple (Vermeer et van Maanen 2001; Montesano et Bartsch 1976; Brown 1999).

Bien que la cancérogénicité des NOC soit établie chez les animaux, aucune preuve directe de cet effet n'a été démontrée jusqu'à présent chez l'humain. Les résultats d'études épidémiologiques sur ce sujet sont très équivoques, bon nombre d'entre elles étant suggestives. En général elles supportent majoritairement l'existence d'une association positive entre l'ingestion de nitrates/nitrites ou de nitrosamines et le risque de cancer gastrique (Jakszyn et Gonzalez 2006). Malgré ce manque d'évidence, les humains se sont tout de même révélés réagir aux nitrosamines suivant un profil comparable à celui observé chez les animaux expérimentaux en terme de toxicité aigue (nécrose hépatique et cirrhose), de disposition métabolique et de formation d'adduits à l'ADN (Brown 1999). La 3-méthyladénine est justement un marqueur de la formation d'adduits entre NOC et ADN. Outre cela, les études de dosimétrie chez l'humain démontrent clairement l'évidence d'une nitrosation endogène (Gangolli et al. 1994). Finalement, parce que les NOC sont cancérigènes chez les espèces animales testées, on considère qu'ils le sont aussi probablement, sinon possiblement chez l'humain.

#### **2.4.4 Indice de potentiel cancérigène**

La rédaction de cette partie a été majoritairement inspirée du guide technique décrivant les indices de potentiel cancérigène de l'Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA) de l'agence californienne de la protection de l'environnement, CalEPA (OEHHA 2005).

Les excès de risque de cancer (ER) hypothétiques associés aux substances cancérigènes de l'environnement sont évalués grâce à des indices de potentiel cancérigène propre à chaque substance. Ces derniers sont estimés sur la base d'analyses biologiques du cancer chez les animaux ou d'études épidémiologiques; ces dernières étant de loin préférées aux premières. Mais compte tenu de la rareté des études épidémiologiques bien construites et des limites de celles-ci lorsqu'elles existent, les évaluations vont généralement se faire avec les données d'expérimentations animales. Ainsi, pour fins d'évaluations, on ne retiendra que les études animales pour lesquelles on observe une augmentation statistiquement significative de l'incidence de cancer (tumeurs) et une relation dose/réponse. Les données des taux d'incidences des tumeurs des études retenues sont aussi classées en fonction des sites (organes cibles) et des types de tumeurs. Ainsi des courbes doses/réponses sont ajustées à celles-ci en fonction de cette catégorisation, et pour chaque substance étudiée. Soulignons que la réponse ici est l'incidence de cancer chez les animaux. Si cependant il existe pour la même substance des groupes de données comparables pour l'espèce, la souche, le sexe et le type de tumeurs, alors une dose équivalente est préalablement déterminée pour chaque étude ou chaque set de données. Cette dose peut-être normalisée pour la durée de l'exposition, dans quel cas, l'US EPA recommande de la calculer comme suit:

$$d = \frac{l_e \times m}{L_e \times PC^{2/3}} \quad (3)$$

Où  $d$  (mg/surface de la peau/jour) : dose équivalente;  $l_e$  : durée d'exposition;  $L_e$  : durée de l'expérience;  $m$ : dose moyenne (mg/jour);  $PC$  : poids moyen de l'animal.

N.B : l'US EPA assume que la dose exprimée par unité de surface de la peau est équivalente entre espèces qu'elle ne l'est par unité de poids corporel. L'agence considère donc que la surface est proportionnelle au poids corporel de l'animal à la puissance  $^{2/3}$ .

Or lors des expérimentations, les animaux sont généralement exposés à des doses beaucoup plus élevées que les niveaux d'exposition réelle au sein de la population. C'est donc pour cette raison que la courbe dose/réponse sera par la suite extrapolée à partir des

niveaux d'exposition de l'étude jusqu'à une dose nulle, tout en supposant qu'il n'existe pas de seuil en dessous duquel le cancer est improbable. Habituellement, ces extrapolations aux faibles doses sont basées sur le site et l'espèce les plus sensibles des études de cancérogénicité. Aussi, ces mêmes extrapolations constituent la base des estimations des indices de potentiel cancérogène. Ces dernières sont calculées au moyen de modèles mathématiques appropriés qui diffèrent en fonction des agences de réglementation. Dans le cadre de ce projet, nous avons retenu trois méthodologies développées par deux agences américaines. Ce sont elles qui ont justement estimé les indices de potentiel cancérogène des nitrosamines que nous avons étudiées (Tableau 2). Il s'agit : de l'US EPA et de la California EPA. Pour ce qui est de cette dernière, les méthodologies sont celles de ses départements : Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA) et Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS).

Ainsi, selon l'Integrated Risk Information System de l'US EPA (IRIS EPA), l'extrapolation aux doses faibles se fait par l'application de la procédure linéarisée par étapes multiples (LMS). Il s'agit d'un modèle statistique pouvant décrire la relation dose/réponse linéaire sans seuil aux faibles doses. Il intègre aussi une procédure pour l'estimation de la pente linéaire la plus élevée possible aux doses faibles. La fonction polynomiale de la procédure LMS est la suivante :

$$P(d) = 1 - \exp[-(q_0 + q_1 d + q_2 d^2 + \dots + q_k d^k)] \quad (4)$$

Où P (d) est le risque (ou probabilité) de cancer résultant d'une exposition à une dose d la vie durant;  $q_i > 0$ , et  $i = 0, 1, 2, \dots, k$ .

De manière équivalente :

$$A(d) = 1 - \exp[-(q_1 d + q_2 d^2 + \dots + q_k d^k)] \quad (5)$$



Où  $A(d) = \frac{[p(d) - p(0)]}{[1 - p(0)]}$  est l'excès de risque de cancer à la dose  $d$  par rapport aux contrôles.

L'optimisation de cette fonction permet de déterminer la pente s'ajustant le mieux à l'ensemble des données : c'est le paramètre  $q_1$  encore appelé « facteur de pente ». Ce dernier est présenté comme étant le risque par (mg/kg)/jour. La limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95</sub>) sur  $q_1$ , dénommée  $q_1^*$  est considérée être l'indice de potentiel cancérigène. Ainsi, lorsque  $q_1 \neq 0$ , aux faibles doses, l'ER est sensiblement de la forme :

$$A(d) = q_1 \times d \quad (6)$$

Cette relation correspond à la limite supérieure de l'IC<sub>95</sub> sur l'ER et ER/ $q_1$  est une estimation de la limite inférieure de l'IC<sub>95</sub> sur la dose produisant un excès de risque R.  $q_1^*$  calculé à très faibles doses est toujours linéaire à la dose et est considéré comme la limite supérieure du potentiel d'une substance à induire le cancer à de faibles niveaux d'exposition. On l'utilise donc comme indice de potentiel cancérigène pour les estimations des ER hypothétiques.

Les procédures utilisées pour l'extrapolation aux faibles doses chez l'humain des ER à partir des données animales de cancérogénicité assument généralement que les agents qui causent le cancer causent aussi des dommages à l'ADN, et que la réponse biologique quantale qui caractérise la mutagenèse est associée à une relation linéaire dose/réponse sans seuil. C'est pourquoi l'US EPA qualifie de conservatrices les évaluations de risque faites avec le modèle LMS.

Pour ce qui est de l'OEHHA, il considère que la procédure LMS est appropriée dans la majorité des cas, à l'exception de ceux où des données empiriques suffisantes sont disponibles pour indiquer une courbe dose-réponse de type «quasi-seuil». C'est l'exemple d'une courbe qui serait aplatie pour deux ou trois niveaux de doses, puis se recourberait brusquement vers le haut. Dans ce cas, la procédure LMS pourrait sous-

estimer le nombre d'étapes et surestimer les risques à faibles doses. Le modèle multihit gamma est alors suggéré comme étant une alternative potentielle.

Par ailleurs, le guide de l'OEHHA assume qu'en absence de preuves contraires, une substance qui cause le cancer après ingestion peut le faire aussi lorsque l'exposition a lieu par inhalation et *vice versa*. Dans ce cas, on utilisera la correction « surface de la peau  $\sim PC^{2/3}$  ». La relation est la suivante :

$$UR = \frac{CPF \times 20 m^3}{70 kg \times CV} \quad (7)$$

Où UR ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )<sup>-1</sup> : risque unitaire; CPF (cancer potency factor) : indice de potentiel cancérigène; 70 kg : poids corporel (PC) de référence chez l'humain; 20 m<sup>3</sup> : taux d'inspiration de l'air /jour; CV : facteur de conversion de mg en  $\mu\text{g}$  (= 1000).

Le risque unitaire décrit l'excès de risque de cancer associé à l'inhalation d' 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  d'une substance donnée. L'indice de potentiel cancérigène décrit l'excès de risque de cancer associé à l'exposition de 1 mg d'une substance donnée par kg de poids corporel. Le guide recommande l'utilisation de la limite supérieure de l'IC<sub>95</sub> sur le risque comme référence dans l'évaluation de la relation dose/réponse.

Le RCHAS pour sa part a dérivé des valeurs d'indices de potentiel cancérigène répertoriées dans une proposition de loi américaine dite « Proposition 65 ». Il existe 2 versions de celle-ci : la standard (RCHAS-S) qui utilise la même méthodologie que l'OEHHA, et l'express (RCHAS-E) qui diffère un peu de la première.

Ainsi, la procédure utilisée par le RCHAS-E pour estimer les valeurs de potentiel cancérigène de la Proposition 65 express (dite « expedited Proposition 65 cancer potency values » ou « RCHAS-E » tout court) diffère de la méthodologie habituelle de l'OEHHA en deux sens. Premièrement, elle se base sur les données de relations doses/réponses de cancer évaluées et extraites de la littérature originale. Deuxièmement,

le choix de la procédure LMS pour générer les valeurs de potentiel cancérigène est automatique, les ajustements pharmacocinétiques n'étant pas requis.

Ainsi, le RCHAS –E utilise la même formule polynomiale que l'OEHHA, c'est-à-dire celle de l'IRIS EPA. Dans ce cas, le  $q_1^*$  est aussi un estimé de la borne supérieure de l'IC<sub>95</sub> sur le paramètre linéaire  $q_1$ . Cependant, les différences entre ses valeurs et celles de l'IRIS sont généralement dues à de simples différences de méthodes de calculs.

Tableau 2. Indices de cancérogénicité utilisés pour l'analyse de risque et leurs caractéristiques

<b>Nitrosamines</b>							
	<b>NDBA</b>	<b>NMEA</b>	<b>NPPA</b>	<b>NDEA</b>	<b>NDMA</b>	<b>NPIP</b>	<b>NPYR</b>
<b>Propriétés physico-chimiques</b>	PM = 158.2 PÉ = 116°C à 14 mmHg PF = 0.5°C PV non répertorié FCA (25°C): 1 ppm = 6.46mg/m <sup>3</sup>	PM = 88.13 PÉ = 163°C PF : ND PV : ND FCA: 1 ppm = 3.61mg/m <sup>3</sup>	PM = 130.12 PÉ : ND PF : ND PV (20°C) = 0.086 mmHg FCA : 1 ppm = 5.3mg/m <sup>3</sup>	PM = 102.1 PÉ = 175-177°C PF non trouvé PV (20°C) = 0.86 mmHg FCA (25°C): 1 ppm = 4.2 mg/m <sup>3</sup>	PM = 74.1 PÉ = 151°C PF incertain PV (20°C) = 2.7 mmHg FCA (20°C): 1 ppm = 3.1 mg/m <sup>3</sup>	PM = 114.15 PÉ = 217 °C à 721 mmHg PF : ND PV : ND FCA: 1 ppm = 4.7 mg/m <sup>3</sup>	PM = 100.1 PÉ = 214°C PF : ND PV : ND FCA: 1 ppm = 4.10mg/m <sup>3</sup>
<b>Humain</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>7</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>9.4</b>	<b>2.1</b>
<b>Études critiques</b>	Bertram et Craig (1970)	Druckrey et al. (1967)	Druckrey et al. (1967)	Peto et al. (1982)	Peto et al. (1982, 1984)	Eisenbrand et al. (1980)	Preussmann et al. (1977)
<b>Méth.</b>	LMS	Modèle One-hit	Modèle One-hit	LMS	LMS	Méth. RCHAS- E	LMS
<b>Sources</b>	RCHAS - S	IRIS	IRIS	RCHAS - S	RCHAS - S	RCHAS - E	IRIS
<b>Class. US EPA</b>	B2	B2	B2	B2	B2	NC	B2
<b>Class. IARC</b>	2B	2B	2B	2A	2A	2B	2B

$q_{\text{humain}}$  (mg/kg.jr)<sup>-1</sup> : indice de potentiel cancérogène chez l'humain; PM : poids moléculaire; PÉ : point d'ébullition; PF : point de fusion; PV : pression de vapeur; FCA : facteur de conversion dans l'air; RC : risque cumulatif; ND : non disponible; NDEA : N-nitrosodi-N-butylamine; NMEA : N-nitroso-N-méthyléthylamine; NPPA : N-nitroso-N-propylamine; NDEA : N-nitrosodiméthylamine; NDMA : N-nitrosodiméthylamine; NPIP : N-nitrosopiperidine; NPYR : N-nitrosopyrrolidine; Class. : classification; Méth. : Méthodologie. IRIS: Integrated Risk Information System, U.S. Environmental Protection Agency (US EPA); RCHAS - S: Standard Proposition 65 document, Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA); RCHAS - E: Expedited Proposition 65, OEHHHA. LMS: procédure linéarisée en étapes multiples. Données tirées de OEHHHA (2005).

Plus précisément par exemple, le RCHAS-E assume que : «le risque de cancer croît avec 3<sup>e</sup> puissance de l'âge ». Ainsi, la durée d'exposition ( $T_e$ ) pouvant varier d'une étude à l'autre, elle assume la durée de vie des rats et souris à environ 2 ans (104 semaines). C'est ainsi qu'elle estime le potentiel cancérigène chez l'animal comme suit :

$$q_{animal} = q_1^* \times \left[ \frac{104 \text{ semaines}}{T_e} \right]^3 \quad (8)$$

Un indice de cancérigénicité chez l'humain est estimé par la suite de la manière suivante:

$$q_{humain} = K \times q_{animal} \quad (9)$$

$$\text{Où } K \text{ (facteur de conversion entre espèces)} = \left( \frac{PC_{humain}}{PC_{animal}} \right)^{1/3} \quad (10)$$

Tout comme l'OEHHA, elle considère que la surface corporelle est plus indiquée pour intégrer la susceptibilité inter-espèces aux substances toxiques par rapport au poids corporel.

$$\text{Ainsi, } SC = k \times PC^{2/3} \quad (11)$$

Où SC est la surface corporelle de la peau; k une constante; PC le poids corporel.

Des tests récents suggèrent plutôt d'utiliser  $PC^{3/4}$  pour les comparaisons de doses inter-espèces. Mais en fait, utiliser la puissance  $3/4$  résulterait seulement à diminuer les facteurs de potentiel cancérigène de 2 fois lors de l'extrapolation à partir des rats.

Il est pris pour acquis que l'utilisation du facteur de pente surestime l'incidence réelle de cancers aux faibles doses associée aux substances cancérigènes. C'est la raison pour laquelle les différentes agences réglementaires (US EPA, Santé Canada) qualifient cette approche de conservatrice (Santé Canada 2004b).

## 2.4.5 Cas particulier des nitrosamines

Les nitrosamines testées se sont révélées être cancérigènes chez plus de 30 animaux de laboratoire, dont la plupart étaient des rats, des souris et des hamsters. Leur synthèse qui se fait normalement en milieu acide est catalysée par les thiocyanates. Les nitrosamines sont très organotropiques (organe-spécifique), animal spécifique et induisent généralement des tumeurs à des sites spécifiques sans égard à la voie d'administration (Vermeer et van Maanen 2001; Mirvish 1995; Dietrich et al. 2005).

### 2.4.5.1 Origine

Comme il a été fait mention au paragraphe 2.6.1 sur les NOC, les nitrosamines sont des substances issues de l'attaque nucléophile de l'atome d'azote contenues dans des composés aminés par des oxydes d'azote. Elles peuvent avoir une origine exogène (nitrosamines préformées) ou être plutôt issues de la synthèse endogène. Nous nous attarderons dans cette partie sur la synthèse endogène des nitrosamines.

Les nitrosamines endogènes proviennent de la nitrosation de précurseurs aminés qui se retrouvent dans l'organisme : amines primaires aliphatiques, amines secondaires et tertiaires, peptides, acides aminés primaires et secondaires. Cependant, l'exposition endogène est majoritairement due à la nitrosation des amines secondaires ayant des substitués dialkyl, alkaryl ou diaryl. Le site majeur de leur formation est le tractus gastro-intestinal, particulièrement l'estomac. Cependant, d'après les résultats de récentes études, celle-ci serait maximale au niveau de la région oesophago/cardiale. En effet, non seulement elle est bien distante de l'antrum où est synthétisée la vitamine C inhibitrice de la nitrosation, mais aussi, elle constitue la seule partie de l'estomac capable de rester très acide et à contenir le maximum d'espèces actives nitrosantes même après un repas.(McColl 2007; Suzuki et al. 2005).

Étant donné que toutes les cellules de l'organisme contiennent des amines (constituant des protéines cellulaires), la synthèse endogène des nitrosamines peut aussi avoir lieu à divers autres endroits de l'organisme (cavité orale, intestin, duodénum, poumons et certains organes infectés) suite à la formation endogène d'oxyde nitrique et de nitrites ou simplement par réduction bactérienne du nitrate en nitrite (Bartsch et al. 1989). En effet,

comme nous l'avons mentionné plus tôt en parlant de la synthèse endogène des nitrates (paragraphe 2.1.4.5), l'enzyme NO-synthase se retrouve dans toutes les cellules de l'organisme et par conséquent l'oxyde nitrique lui aussi. Pour ce qui est de la réduction bactérienne, celle-ci a le plus souvent lieu lors d'infections : de la vessie urinaire (bilharziose), de l'estomac par *H. pylori*.

Les contributions relatives de ces voies à l'exposition totales aux nitrosamines restent malheureusement encore inconnues (IPCS 1999). La nitrosation peut aussi avoir lieu par catalyse bactérienne à pH neutre par exemple dans l'estomac achlorhydrique (Mirvish et al. 2000).

#### 2.4.5.2 Précurseurs aminés

Les précurseurs aminés des nitrosamines incluent: les amines primaires aliphatiques, les amines secondaires et tertiaires, les peptides, les acides aminés primaires et secondaires (Montesano et Bartsch 1976; Kyrtopoulos 1989; Shephard et al. 1987).

En tant que constituants des protéines cellulaires, certains de ces précurseurs aminés se retrouvent dans l'organisme (Tannenbaum et al. 1991). Ils sont aussi très largement répandus dans l'environnement : alimentation, produits manufacturés (tels les médicaments, pesticides), milieu de travail. Dans l'alimentation par exemple, on les retrouvera dans tous les types d'aliments, mais avec des teneurs variables. C'est le cas par exemple de la diméthylamine, une des amines secondaires les plus étudiées, qui est très répandue dans les produits marins (Mirvish 1975; Shephard et al. 1987) dont certaines espèces en sont particulièrement concentrées (œufs de Merlan, pieuvre, sardines, morue, maquereau, perche) (Phaneuf et al. 2004). Plusieurs amines secondaires et tertiaires sont aussi utilisées dans la fabrication des médicaments ou des pesticides (Mirvish 1975). Dans le cas de ceux-ci, vu qu'ils sont surtout utilisés pour la culture des fruits et légumes, leur ingestion se fera principalement *via* ces derniers. Parmi les pesticides on peut citer : les méthylcarbammates, les méthylthiocarbammates ou les dérivés de triazine. Plusieurs auteurs ont démontré la formation *in vivo* du NDMA à partir des méthylthiocarbammates (composants des fongicides tecoram et Zireb). On a obtenu les mêmes résultats avec les dérivés de la diméthylurée : chloroxuron (3-(4-(4-

chlorophenoxy)-phenyl)-1, 1-dimethylurea) et cycluron (3-cyclo-octyl-1,1-dimethylurea) qui sont utilisés comme herbicides (Egert et Greim 1976).

Pendant que plusieurs de ces composés aminés peuvent donner des nitrosamines cancérigènes suite à leur nitrosation, ceci n'est pas toujours le cas pour bon nombre d'entre eux. C'est par exemple le cas des amines tertiaires qui ne peuvent pas être nitrosés ou celui des amines primaires dont la nitrosation génèrerait des nitrosamines instables (Andrzejewski et al. 2008). C'est d'ailleurs pourquoi les amines primaires sont considérées comme des trappes à nitrites et sont donc responsables de la perte majeure de ceux-ci dans l'estomac (Kyrtopoulos 1989). Ainsi, la nitrosation *in vivo* des simples amines tertiaires ne serait vraisemblance pas importante sur le plan biologique. L'ingestion chronique par les rats de triméthylamine + nitrite (0,5% chacun dans la diète) n'a justement pas induit de tumeurs après un an d'exposition. Par ailleurs, la seule amine tertiaire dont la cinétique de nitrosation a été étudiée est l'analgésique aminopyrine (AP) qui est rapidement nitrosé pour former la NDMA et un autre composé à chaîne cyclique ouverte (Mirvish 1975)

Seules les amines secondaires constituent finalement les précurseurs aminés les plus importants dans la formation des nitrosamines (Andrzejewski et al. 2008). Entre autres amines secondaires, nous pouvons citer : la diméthylamine, la diéthylamine, la n-dibutylamine, la pyrrolidine, la méthyléthylamine, la pipéridine, la N-méthylbenzylamine, la morpholine (Shephard et al. 1987).

En somme, le fait que la plupart des amines nitrosables soient soit synthétisées dans l'organisme, soit largement répandues dans l'alimentation ou les deux, impliquent que ces substances se retrouvent généralement ensemble dans des conditions de nitrosation endogène. Ceci explique alors l'intérêt considérable que suscitent les risques possibles de cancer émanant de la formation endogène de nitrosamines.

### **2.4.5.3 Cinétique de la N-nitrosation (constante de nitrosation)**

La réaction de nitrosation dépend beaucoup des composés aminés. Les acides aminés par exemple sont moyennement nitrosés. C'est d'ailleurs une des raisons avancées pour expliquer que leurs dérivés nitroso- soient faiblement



cancérogènes ou ne le soient carrément pas. Par ailleurs, pendant que la nitrosation des amines secondaires donne lieu aux nitrosamines stables, celle des amines aliphatiques primaires donne des alcools et oléfines, *via* les monoalkylnitrosamines instables. Dans le même ordre d'idées, soulignons que si la nitrosation des amines secondaires attire autant l'attention, c'est aussi parce que ces substances sont largement répandues dans l'alimentation. Parmi les dérivés nitrosamines de ce groupe de composés, les dialkylnitrosamines (par exemple le NDMA et le NDEA) sont les plus stables dans l'acide; les alkyl-arylnitrosamines quant à elles se réarrangent dans l'acide pour former des composés C-nitrosés : c'est l'exemple de la N-nitroso-N-méthylaniline qui se réarrange en p-nitroso-N-méthylaniline.(Mirvish 1975a).

La réaction de nitrosation endogène la mieux connue et la plus étudiée est celle ayant lieu dans l'estomac. Celle-ci dépend de l'interaction de plusieurs facteurs à savoir : le pH de l'estomac (acidité), la basicité de l'amine et la concentration des substrats. Cette réaction qui est très sensible au pH exige pour avoir lieu que le milieu soit acide. Elle est justement catalysée par l'acidité du suc gastrique. Ceci dit, dans l'estomac, elle est habituellement initiée par la conversion du nitrite en acide nitreux  $\text{HNO}_2$  dont le  $\text{pK}_a = 3,37$ . Ce  $\text{pK}_a$  acide indique d'ailleurs que la nitrosation soit catalysée par l'acide. En effet, de par son instabilité, l' $\text{HNO}_2$  est par la suite converti en espèces actives nitrosantes : le  $\text{NO}^+$ , l'anhydride nitreux ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), le nitrosyl thiocyanate (ON-NCS), le nitrosyl halide (NOX), ou l'ion acidium nitreux ( $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ ). Notons que ni les nitrites, ni l'acide nitreux ne sont capables de nitrosation de leur propre chef, mais plutôt leurs dérivés nitrosant (Foster et al. 1981). En plus des nitrates/nitrites ingérés, les espèces nitrosantes peuvent aussi être formées à partir des  $\text{NO}_2$  et  $\text{NO}$  provenant de la synthèse endogène comme il a été fait mention dans la section portant sur la synthèse endogène des nitrates (paragraphe 2.1.4.5). En effet, le  $\text{NO}$  est une espèce labile qui est très rapidement oxydée en  $\text{NO}_2$ , lequel serait en équilibre avec les agents nitrosant  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Tannenbaum et al. 1991). De toutes les espèces nitrosantes, le  $\text{N}_2\text{O}_3$  est l'agent le plus réactif (Mirvish 1995; McColl 2007). En plus d'être responsable de la formation de nitrosamines cancérogènes, le  $\text{N}_2\text{O}_3$  serait lui aussi mutagénique. En effet, il est capable de désaminer certaines bases de l'ADN et d'inactiver ses enzymes de réparation

(Combet et al. 2007). En présence des  $N_2O_3$ , la nitrosation des amines secondaires serait maximale à  $pH = 3,4$  qui se trouve être justement le  $pK_a$  de l' $HNO_2$  (Mirvish 1995). La nitrosation de la majorité des amines secondaires par le  $N_2O_3$  se fait suivant les équations suivantes : <sup>3</sup>



$$\text{Taux} = K_1 [R_2NH] [HNO_2]^2 \quad (14)$$

$$\text{Taux} = K_2 [\text{amine}] [\text{nitrite}]^2 \quad (15)$$

D'après l'équation (13), l'espèce nitrosante  $N_2O_3$  est produite à partir de deux molécules de  $HNO_2$ . De plus, le taux de nitrosation est proportionnel à la concentration de l'amine et au carré de celle des nitrites (équations (15) et (16)). Cependant l'auteur (Mirvish 1975) recommande d'utiliser l'équation (16) car elle est la plus facile à appliquer. En effet, dans cette équation, on utilise les concentrations totales de nitrites et d'amines sans égard aux espèces réellement présentes en solution. Nous insisterons sur le fait que les conditions acides sont très importantes pour ce type de réaction car si tel n'est pas le cas, on a beau avoir de grandes quantités de nitrites, leur contribution ne sera que très faible sur la nitrosation. Pourtant en conditions favorables, la résultante de petites quantités pourrait s'avérer majeure après la nitrosation.

Revenons aux équations précédentes. Si  $K_1$  est une constante, alors  $K_2$  devient une fonction du  $pK_a$  de l'amine. En combinant les équations (15) et (16), on obtient alors : <sup>4</sup>

$$K_2 = \frac{K_1 \times [R_2NH] \times [HNO_2]^2}{[\text{amine}] \times [\text{nitrite}]^2} \quad (16)$$

$$\text{Soit } K_2 = \frac{2,5 \times 10^4}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (17)$$

<sup>3</sup> Ces équations portant sur la cinétique de la nitrosation ont été tirées de Mirvish (1975)

<sup>4</sup> Ces équations portant sur la cinétique de la nitrosation ont été tirées de Mirvish (1975)

$$\text{Ainsi à pH} = 3,4 \rightarrow K_2 = 7,8 - \text{pKa} \quad (18)$$

Cette équation pourrait être d'une grande utilité pour prédire la constante de nitrosation  $K_2$  d'une amine secondaire si son pKa est connu.

Des résultats obtenus soutiennent le fait que la nitrosation peut avoir lieu en d'autres sites que l'estomac. Il s'agirait de sites qui seraient non accessibles par l'ASC, et donc le mécanisme de nitrosation serait différent de celui en milieu acide (Tannenbaum et al. 1991).

Pour ce qui est de la basicité de l'amine, la nitrosation est inversement proportionnelle à celle-ci, c'est-à-dire à son pKa (Kyrtopoulos 1989). Ainsi, plus la basicité de l'amine diminuera (pKa diminue), plus sa nitrosation sera rapide (tel que indiqué par la constante  $K_2$  en (18)), c'est-à-dire que son taux de nitrosation sera d'autant plus élevé. C'est pourquoi les bases faibles telles la pyrrolidine ( $K_2 = 0,005$ ) seront nitrosées beaucoup plus rapidement que les bases fortes comme la diméthylamine ( $K_2 = 0,002$ ).

Mirvish fait partie de ceux qui se sont investis dans les études portant sur la cinétique de la nitrosation *in vitro*. L'une de ses études (Mirvish 1975) constitue d'ailleurs une bonne référence pour les constantes de nitrosation de bon nombre de composés. Par ailleurs, les travaux de cinétique réalisés jusqu'à l'heure actuelle suggèrent que les taux de nitrosation *in vivo* correspondent très bien à ceux d'études *in vitro*. En effet, selon Shephard et al. (1987) : « des études de nitrosation *in vivo* chez la souris ...ont conclu que les taux de nitrosation *in vivo* et *in vitro* corrélaient bien. Des études de la cinétique de nitrosation *in vivo* ...chez les rats ont aussi pu démontrer que l'équation de la cinétique *in vitro* était applicable à la nitrosation dans l'estomac du rat et était aussi compatible avec les données humaines...En outre, on a découvert que l'*in vivo* nitrosation relative ...corrélait avec les données *in vitro* des taux de réactivité relative publiés par Mirvish en 1975. Ces travaux suggèrent qu'en absence de données *in vivo*, la connaissance des taux de nitrosation *in vitro* des différents précurseurs constitueraient une base raisonnable pour prédire la nitrosation relative *in vivo*. Et

l'estimation des constantes de nitrosation relatives de plusieurs classes de composés pourrait se faire aisément sur la base de données d'études *in vitro* réalisées par Mirvish en 1975.»

La nitrosation peut aussi être catalysée par les bactéries lorsque le pH est neutre, par exemple dans l'estomac hypochlorhydrique d'individus ayant des gastrites chroniques. En effet, l'hypochlorhydrie favorise la croissance bactérienne dans l'estomac, dont celle des souches possédant une activité nitroréductrice (IPCS 1999; Mirvish 1995).

#### 2.4.5.4 NPRO test

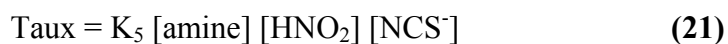
Pour des considérations d'ordre éthique, les études cinétiques de la nitrosation *in vivo* n'ont pu se faire qu'avec la proline en présence de nitrites, car le dérivé nitrosoproline (NPRO) est quantitativement excrété dans l'urine et est considéré non cancérigène (Vermeer et van Maanen 2001; Mirvish 1995; Ohshima et Bartsch 1981). Ceci a donc été à la base du principe du NPROtest. Il s'agit d'une méthode simple et sensible mise au point pour estimer quantitativement la nitrosation endogène chez l'humain (Tannenbaum et al. 1991; Bartsch et al. 1989). À cause de son groupement alpha-carboxy, la nitrosation de la proline est maximale aux pH 1,5 – 2,7, au lieu de pH 3 – 3,3 comme c'est le cas de la plupart des autres amines. Cependant, son taux de nitrosation est proportionnel au carré de la concentration des nitrites comme c'est le cas avec les autres amines, et sa constante de nitrosation K est intermédiaire à celles des autres. C'est donc pour ces raisons que la NPRO constitue raisonnablement un bon indicateur de la formation endogène de nitrosamines (Mirvish 1995). Ce test permet d'estimer la capacité nitrosante de l'estomac, donc la formation endogène des nitrosamines et non pas d'estimer les quantités de précurseurs amines ou nitrates/nitrites (Mirvish 1995). La méthode peut être mise au point de différentes manières. Cependant, indépendamment de la manière dont est conduit le test, la L-proline est utilisée comme sonde des amines nitrosables, et la N-nitrosoproline (NPRO) et l'acide N-acétique (NAA) excrétés dans l'urine représentent les marqueurs de la nitrosation endogène. Ce test se base sur le fait que la NPRO préformée et ingérée *via* la diète n'est pas métabolisée par l'homme (Gangolli et al. 1994). Ainsi suite à son ingestion, elle est

rapidement et presque totalement éliminée dans les urines 24 heures (excrétion quantitative) après son ingestion. Ainsi, la différence entre les quantités de NPRO excrétées dans l'urine et celles ingérées *via* la diète est considérée être issue de la nitrosation endogène. Pour la réalisation du test, la L-proline peut-être appliquée seule, avec du nitrate ou avec la vitamine C (Gangolli et al. 1994; Bartsch et al. 1989).

#### 2.4.5.5 Modulateurs de la N-nitrosation

La nitrosation peut être catalysée par les halides et les thiocyanates ( $\text{NCS}^-$ ) (Mirvish 1995). Ces derniers catalyseraient la nitrosation par l'intermédiaire de la formation des espèces nitrosantes  $\text{ON}\cdot\text{NCS}$ . Elles pourraient se révéler majeures sur la nitrosation intra-gastrique vu qu'elles sont formées dans la salive, particulièrement celle des fumeurs (environ 6 mM  $\text{NCS}^-$ ) et dans le suc gastrique (environ 0,2 – 0,7 mM  $\text{NCS}^-$ ). Le pH de la nitrosation à concentrations élevées de  $\text{NCS}^-$  est de 2 lorsque les nitrites sont pratiquement tous protonés. En deçà de  $\text{pH} = 2$ , le taux baisse car c'est le  $\text{NCS}^-$  qui devient protoné (Mirvish 1995). Les bromures ( $\text{Br}^-$ ) et les chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) ont un effet similaire à celui du  $\text{NCS}^-$ , suite à la formation du  $\text{NOBr}$  et du  $\text{NOCl}$ , mais les taux ne diminuent pas pour un pH inférieur à 2. L'ordre de réactivité est le suivant :  $\text{NCS}^- \gg \text{Br}^- > \text{Cl}^-$  (Rowland et Grasso 1975).

Les réactions ayant lieu lors de la catalyse par les thiocyanates sont les suivantes <sup>5</sup> :



L'attaque nucléophile par les agents nitrosant anhydre nitreux [ $\text{N}_2\text{O}_3$  ( $\text{ON}\cdot\text{ONO}$ )], nitrosylthiocyanate ( $\text{ON}\cdot\text{NCS}$ ) et halide nitreux ( $\text{NOX}$ ) est similaire et par conséquent l'ordre de réactivité des amines avec le  $\text{N}_2\text{O}_3$  (équation (14)) serait le même qu'en présence de  $\text{NONCS}^-$  et  $\text{NOX}$ . Au contraire du  $\text{N}_2\text{O}_3$  qui lorsque seul agit maximalelement à  $\text{pH} = 3,4$  les thiocyanates catalyseraient la nitrosation à des valeurs de  $\text{pH} < 3,4$  (Mirvish 1975).

<sup>5</sup> Tirés de Mirvish (1975).

Plusieurs variétés de composés se sont révélés être inhibiteurs de la nitrosation *in vitro*. Il s'agit : des vitamines (acide ascorbique, alpha-tocophérol), des composés phénoliques (catéchol, acides phénoliques, hydroquinones), de certains mélanges complexes (boissons alcoolisées, produits laitiers, thé), des composés sulphuriques (glutathione, méthionine) et des groupes de composés micellaires (urée, acides gras insaturés, caféine) (Vermeer et van Maanen 2001).

Pour ce qui est de la nitrosation *in vivo*, celle-ci peut être inhibée par divers facteurs dont les vitamines (acide ascorbique, alpha tocophérol), les composés phénoliques (polyphénols du thé), l'acide gallique (un des composants des acides tanniques), les sulfites (utilisés comme agents conservateurs des aliments), la cystéine contenue dans le glutathion, les acides tanniques (retrouvés dans la bière et le thé) (Mirvish 1975; Mirvish et al. 1975).

Les propriétés anti-nitrosantes de l'acide ascorbique ont fait qu'il est depuis longtemps utilisé comme antioxydant dans certains médicaments comme l'oxytétracycline.

La vitamine C peut se retrouver sous deux formes principales : la forme réduite acide ascorbique (ASC) et la forme oxydée anion ascorbate (ASC<sup>-</sup>). Ses principaux produits de transformation sont : l'acide déhydroascorbique (déhydro-ASC) et l'acide dicétoglucorinique (produit instable de la dissociation de l'acide déhydroascorbique). La vitamine C inhiberait la nitrosation, mais n'aurait aucune action sur les nitrosamines préformées. En effet, elle aurait induit la réduction de signes de toxicité aiguë hépatique chez des rats ayant ingéré un mélange de diméthylamine + nitrite, ce qui ne fût pas le cas lors de l'ingestion plutôt de la NDMA préformée (Mirvish 1994).

Il s'agit d'une substance très hydrosoluble et très peu emmagasinée dans le corps. La majeure partie de la dose est rapidement excrétée inchangée dans l'urine. Son inhibition de la nitrosation se ferait alors en solution aqueuse acide (Combet et al. 2007; Mirvish 1986). Cette inhibition dépendrait de la réduction en milieu acide du nitrite en NO par l'ASC qui lui, est en même temps oxydé en déhydro-ASC (Combet et al. 2007; McColl 2007; Sobala et al. 1989). Au cours de ce processus, l'ASC serait en compétition avec les amines pour pouvoir réagir avec le nitrite. Dans cette compétition, l'ASC serait

beaucoup plus rapide que les amines (Combet et al. 2007; McColl 2007). En outre, la vitamine C serait plus efficace à  $\text{pH} > 4,3$  car l'anion ascorbate ( $\text{ASC}^-$ ) qui est 230 fois plus efficace que l'ASC pour réduire le nitrite prédomine dans ces conditions. Compte tenu finalement du fait que son  $\text{pH}$  optimum soit aux environs de 4 (approximativement celui retrouvé dans l'estomac durant la période postprandiale), la vitamine C serait alors le meilleur de tous les autres antioxydants (Sobala et al. 1989). Du fait de cette réaction avec le nitrite, l'ASC est ajouté aux viandes préservées par les nitrites dans le but d'augmenter la formation de NO qui est responsable de la couleur rosée de la nitrosomyoglobine (Mirvish et al. 1975).

Par ailleurs, il a été reporté que le NO issu de l'action de la vitamine C, pouvait régénérer les espèces nitrosantes en réagissant avec l' $\text{O}_2$  moléculaire. En effet, le NO pourrait migrer vers les phases lipidiques et être oxydé en  $\text{NO}_2$  puis en  $\text{N}_2\text{O}_3$  capable de nitroser les amines en phase lipidique. C'est donc pourquoi en présence de lipides, la vitamine C pourrait plutôt promouvoir la nitrosation (Combet et al. 2007; Mirvish 1986). Outre cela, la vitamine C serait activement sécrétée dans l'estomac humain (Combet et al. 2007; Suzuki et al. 2005; Schorah et al. 1991). Le niveau médian normal du mélange (ASC + déhydro-ASC) est de 50mg/L dans le suc gastrique (soit 0,42 mg/h d'ASC) et de 7 mg/L dans le plasma (Mirvish 1994). Cette sécrétion aurait lieu au niveau de l'antrum de l'estomac. C'est donc pour cette raison que l'on pense que la nitrosation serait maximale au niveau de la région cardiaque de l'estomac. En effet, compte tenu du fait de la sécrétion antrale de la vit C, du fait que le thiocyanate provienne de la bouche et de l'acidité postprandiale du cardia, ce dernier serait donc la seule partie pouvant permettre une nitrosation maximale (McColl 2007; Suzuki et al. 2003).

Bon nombre de tests ont été faits *in vitro* et *in vivo* et lors d'expérimentations humaines pour étudier l'inhibition de la nitrosation par la vitamine C. Les résultats des pourcentages d'inhibition varient beaucoup d'une étude à l'autre. Et cette inhibition dépend beaucoup de la dose d'ASC administrée et du moment de l'administration (avec, avant ou après les amines). Pour ce qui est des expérimentations humaines, elles ont été en général conduites avec la proline (PRO). En effet, le dérivé N-nitrosoproline (NPRO)

est non cancérigène, non biotransformé et est entièrement sécrété inchangé dans l'urine. Ainsi, d'après Mirvish (1994), l'ingestion de 1g d'ASC en même temps que le nitrate et la proline a induit une réduction de 81% de la formation de NPRO chez l'humain. Cependant, lorsque la même quantité d'ASC a plutôt été administrée 2h avant, avec, 1h et 2h après un repas enrichi en proline, l'excrétion de NPRO fût diminué de 94, 100, 87 et 25% respectivement. Des essais avec des jus de fruits ont laissé suggéré que d'autres composés en plus de la vitamine C seraient impliqués dans l'inhibition. En effet, le même auteur a reporté des inhibitions de 41 à 63% de la formation de NPRO par les jus d'ananas, de fraises et de carottes. Cependant lorsque 46 mg d'ASC dans 100 ml d'eau fût administré, l'inhibition ne fût que de 24%. Les fruits comportent justement d'autres constituant inhibiteurs comme les polyphénols (Mirvish 1994).

Les vitamines C et E et les polyphénols sont des constituants normaux de la diète que l'on retrouve normalement dans les fruits, légumes et grains. Du fait de leur action combinée, ces antioxydants seraient plus efficaces dans les fruits et légumes frais. Leur efficacité serait cependant perdue lors de la cuisson des aliments car ils sont sensibles à la chaleur, particulièrement la vitamine C. On n'a justement observé aucune baisse de l'incidence de cancer gastrique en fonction de la consommation de légumes cuits (OMS 2004).

En outre, le fer hémique de la viande rouge stimulerait la formation de nitrosamines. En effet, celui-ci agirait en catalysant la réduction du nitrate en nitrite par la microflore intestinale, avec pour conséquence l'augmentation de NOC fécaux (Ward et al. 2007).

Plusieurs aliments tels que les viandes préservées et les poissons secs salés qui sont des sources de nitrites et /ou de nitrosamines, sont aussi des sources importantes de sels. Les sels peuvent causer l'inflammation qui, elle pourrait endommager la muqueuse protectrice de l'estomac et par conséquent augmenter le risque de cancer de l'estomac. L'action de *H Pylori* pourrait aussi s'additionner à celle des sels et NOC et potentialiser la cancérogénèse une fois l'épithélium endommagé. *H Pylori* diminue le taux de vitamine C dans l'estomac et de plus, le fer contenu dans la viande rouge est connu comme étant un facteur de croissance essentiel pour *H Pylori*.



En somme, les effets néfastes sur la santé associés aux NOC résultent probablement de l'interaction complexe entre la quantité ingérée de nitrates, l'ingestion concomitante des précurseurs nitrosables, des inhibiteurs de la nitrosation (vit C et alpha tocophérol) et des autres cofacteurs de la nitrosation tels que le fer hémique de la viande, du statut médical qui augmenteraient la nitrosation endogène (ex. maladies inflammatoires chroniques).

#### **2.4.5.6 Biotransformation et toxicité**

Dans cette partie, on s'attardera au cas des nitrosamines secondaires dont particulièrement celui des N-nitrosodiakylamines (= nitrosodiakylamines) car elles sont les plus stables et les plus étudiées.

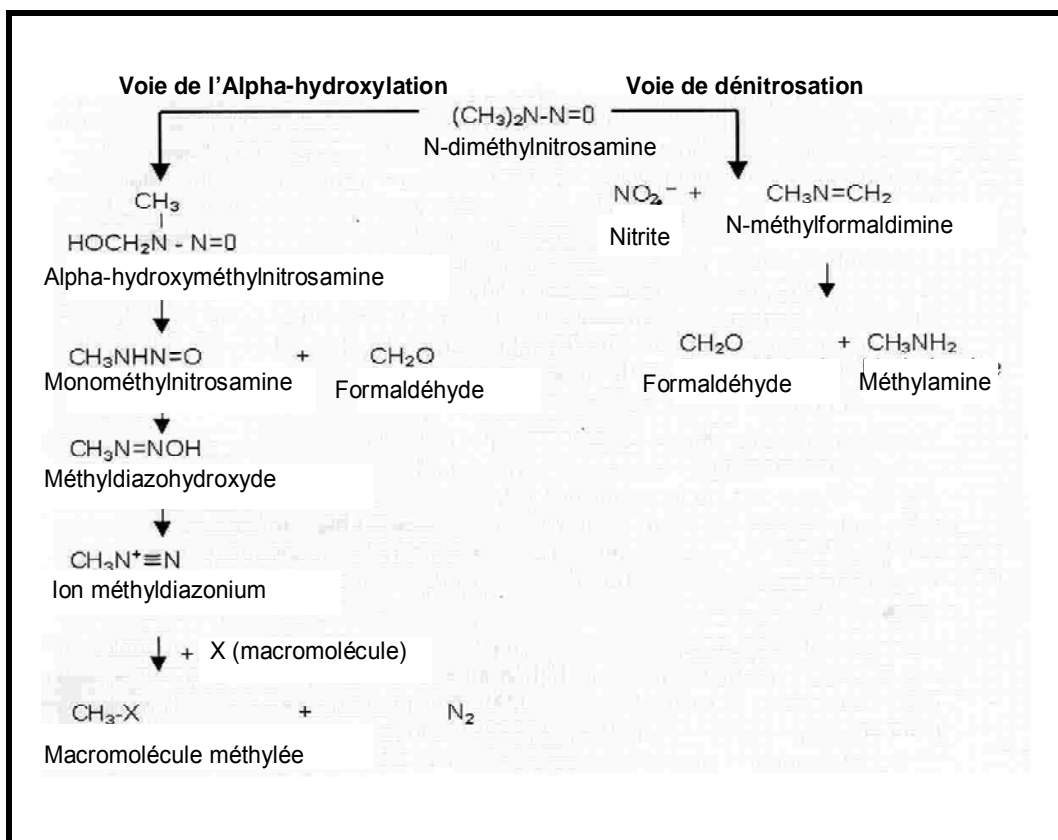
Ceci dit, la biotransformation des nitrosamines serait la cause de leurs effets cancérigènes. L'organe de biotransformation principal de ces substances est le foie, mais celle-ci peut aussi avoir lieu dans d'autres organes tels que les reins et les poumons (Montesano et Bartsch 1976). Ainsi, suite à leur absorption, les nitrosamines (endogènes et exogènes) sont rapidement métabolisées en intermédiaires réactifs qui peuvent se lier de façon covalente aux macromolécules (ADN), initiant le processus de cancérogénèse.

L'activation métabolique des nitrosamines en espèces électrophiles agissant sur l'ADN est très similaire entre les tissus humains et animaux (rongeurs). À cette activation métabolique fait suite l'induction de lésions mutagéniques sur l'ADN qui sont elles aussi similaires entre animaux et humains (Mirvish 1995; Brown 1999). Les expérimentations animales ont justement mis en exergue la formation d'adduits à l'ADN similaires à ceux observés dans les études expérimentales humaines. De plus, les rongeurs présenteraient des signes de toxicité aiguë (nécrose hépatique et cirrhose) similaires à ceux observés chez l'humain (Brown 1999). En effet, l'isoforme CYP2E1 du P-450 chez les rongeurs est le même que l'on retrouve dans le réticulum endoplasmique de la fraction microsomale chez l'humain et qui réagit avec les anticorps anti-souris préparés avec les enzymes de souris (Mirvish 1995).

Deux voies majeures sont impliquées dans la biotransformation des nitrosamines: l'alpha-hydroxylation ( $\alpha$ -hydroxylation) et la dénitosation (figure 2); la première étant de loin la voie majeure (OEHHA 2006). Dépendamment de la longueur de la chaîne des N-nitrosodiakylamines, il peut avoir lieu une  $\beta$ -, une  $\omega$ - ou une  $\omega$ -1-oxydation en plus de la  $\alpha$ -C-hydroxylation (Montesano et Bartsch 1976).

La biotransformation de la majorité des nitrosodiakylamines est initiée par l' $\alpha$ -hydroxylation de la substance sur l'atome de carbone immédiatement adjacent au groupe nitroso (carbone alpha). Cette oxydation résulte en un produit instable (alpha-hydroxydiakylnitrosamine) qui est rapidement décomposé en un aldéhyde et un diazohydroxyde. Ce dernier sera par la suite dissocié en un ion alkyldiazonium (exemples :  $\text{CH}_3\text{N}_2^+$  et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}_2^+$ ) et ultimement en un cation carbonium réactif (exemples :  $\text{CH}_3^+$  et  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+$ ) correspondant (Montesano et Bartsch 1976; Brown 1999). Ce procédé serait médié par une «Oxydase à Fonction Mixte» (OFM), plus précisément les congénères 2E1 de la famille du cytochrome P-450 (Gangolli et al. 1994; Mirvish 1995; Brown 1999). Vu que cette oxydase est présente dans divers types de tissus, l'activation métabolique des nitrosamines peut et en général a lieu au site de formation ou d'application (Foster et al. 1981). Le diazohydroxyde et les intermédiaires subséquents sont non seulement très électrophiles, mais sont aussi des agents alkylants puissants (Gangolli et al. 1994). Leur réaction majeure se fait dans l'eau avec formation d'un alcool, mais ils peuvent aussi réagir avec l'ADN pour produire une variété de bases ADN alkylées. Ceci dit, c'est le groupement alkyl de l'ion alkyldiazonium qui va se charger de « métyler » les composants nucléophiles des macromolécules cellulaires (ADN, ARN et protéines) par transfert d'un groupe méthyle et avec la génération de  $\text{N}_2$ . La détoxification par nitrosation compétitionne avec le processus d'activation métabolique. La dénitosation est aussi catalysée par le P-450. Dans ce cas, la dialkylnitrosamine est tout d'abord métabolisée en intermédiaire imine instable et en oxyde nitrique ( $\text{NO}\cdot$ ). L'ion imine sera par la suite décomposé en formaldéhyde et en une alkylamine (amine primaire) pendant que le  $\text{NO}\cdot$  lui, se combinera à l'oxygène pour générer le nitrite. Le formaldéhyde quant à lui sera oxydé en formate avec dégagement de  $\text{CO}_2$ .

En général, on considère que l'ion carbonium est l'espèce cancérigène qui réagit avec les acides nucléiques pour former des adduits (Brown 1999) (figure 2).



**Figure 2.** Biotransformation de la N-diméthylnitrosamine. Adapté de OEHHA 2006.

Tous les intermédiaires de l' $\alpha$ -hydroxylation sont hautement instables. Le plus stable d'entre eux, l' $\alpha$ -hydroxylation, a une demi-vie d'environ 1 à 10 secondes, suggérant que les nitrosamines soient sans doute activées majoritairement dans l'organe où elles induisent les tumeurs (Mirvish 1995).

Bien que les deux voies soient impliquées dans le métabolisme, l' $\alpha$ -hydroxylation est celle qui forme les intermédiaires réactifs responsables de la cancérrogénicité.

De plus, non seulement les deux voies font intervenir l'OFM dépendante du CYP450, mais aussi le même isoforme de cette enzyme à savoir le CYP2E1. Ce dernier est cependant impliqué dans le métabolisme lorsque les concentrations des nitrosamines sont faibles. À concentrations élevées, d'autres isoformes seraient impliquées (Gangolli et al. 1994; Mirvish 1995; Brown 1999).

Le métabolisme est amplifié par les inducteurs du CYP2E1 tels que : isopropanol, l'éthanol. En effet, l'ingestion de pyrazole ou d'eau prétraitée par de l'éthanol (10%), augmente le taux de métabolisation de plusieurs ordres de grandeurs du NDMA dans le foie et les poumons (Gangolli et al. 1994). Il existe aussi certains inhibiteurs compétitifs des deux voies tels que : l'éthanol, l'acétone, le dioxane, l'isopropanol et le pyrazole. En effet, la quantité de NDMA dans l'urine augmente après ingestion d'alcool car ce dernier est un inhibiteur du métabolisme de la NDMA (Gangolli et al. 1994; OEHHA 2006).

La position principale de méthylation sur les acides nucléiques par bon nombre d'agents alkylant est la position N<sup>7</sup>-alkylguanine. Cependant, l'attaque peut avoir lieu sur d'autres sites tels que : N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup> de l'adénine; la N<sup>3</sup>, -<sup>7</sup> et O<sup>6</sup> de la guanine; la N<sup>3</sup> des cytosine, thymine et uracile; O<sup>4</sup> de la thymine. De celles-ci, les positions majeures sont la N<sup>7</sup> et l'O<sup>6</sup> de la guanine, la O<sup>4</sup> de la thymine. La position N<sup>7</sup> de la guanine n'est cependant pas impliquée dans les effets mutagéniques et cancérigènes. C'est plutôt la O<sup>6</sup> car c'est celle-ci qui est impliquée dans la formation des paires de bases. En effet, les O<sup>6</sup>-alkylguanines forment préférentiellement des paires de bases avec la thymine plutôt que la cytosine, donnant lieu à des mutations (transition) G : C → A : T, connues comme initiateur de la cancérogénèse (Mirvish 1995).

L'enzyme O<sup>6</sup>-méthyl guanine-DNA transférase (MGMT) est responsable de réparer et détruire les adduits O<sup>6</sup>-méthyl guanine et autres O<sup>6</sup>-alkyl guanine/ADN. L'enzyme procède en transférant le groupement méthyle de la guanine de l'ADN sur un résidu cystéine qu'elle contient, résultant ainsi en l'inactivation permanente de l'enzyme. L'activité de la MGMT varie en fonction des espèces et des tissus. On a aussi reporté une forte homologie dans la séquence d'acides aminés de cette enzyme hépatique entre la souris et l'Homme (OEHHA 2006).

Bien qu'il n'y ait pas d'évidence suffisante de la cancérogénicité de ces substances chez l'humain, la panoplie de preuves des études animales poussent à croire que ces substances devraient être considérées comme des cancérogènes chez l'humain en accord avec les lignes directrices de le CIRC. Ainsi, lorsqu'on nourrit les animaux avec des

précurseurs nitrosables tel que la morpholine et les nitrites, on obtient le même type de tumeurs que lorsqu'ils sont exposés à la N-nitromorpholine (Gangolli et al. 1994).

#### **2.4.5.7 Classification**

Le Centre de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le NDMA et le NDEA comme étant « probablement cancérigènes pour l'humain », groupe 2A. La NDBA, la NPPA, la NPIP, la NPYR sont classées « possiblement cancérigènes pour l'humain », groupe 2B. Le National Toxicology Program a classé toutes ces substances comme « raisonnablement anticipées cancérigènes chez l'humain » (Brown 1999).

### **2.5 Études animales de toxicité des nitrates et nitrites**

#### **2.5.1 Toxicité aiguë**

Ce type de toxicité est fonction de la capacité à réduire le nitrate en nitrite et varie selon les espèces : gastrite sévère chez les monogastres et méthémoglobinémie chez les ruminants. Ces derniers sont les plus sensibles du fait de leur grande capacité à réduire le nitrate ( $LD_{50} = 450$  mg/kg de nitrate de sodium chez la vache). Des  $LD_{50}$  de l'ordre de 1600 à 9000 mg/Kg de nitrate de sodium ( $NaNO_3$ ) ont été reportés chez le rat, la souris et le lapin. Cependant, le nitrite étant plus toxique, des  $LD_{50}$  plus faibles de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ) ont été reportées pour ces mêmes espèces : 214, 186 et 180 mg/kg chez la souris, le lapin et le rat respectivement (OMS 2004).

#### **2.5.2 Toxicité sub-chronique**

Après exposition de rats au nitrite de potassium ( $KNO_2$ ) dans l'eau potable pendant 13 semaines, l'hypertrophie de la zona glomerulosa du rein a été observée. L'intensité de celle-ci augmentait avec l'augmentation de la concentration (100, 1000, 3000 mg/L). Une NOEL = 5,4 mg  $KNO_2$  /kg.jour a été déduite de cette étude (OMS 2004). Une étude similaire a confirmé l'induction de l'hypertrophie de la zona glomerulosa du rein avec aussi une NOEL semblable de 5 mg  $KNO_2$ / kg.jour. En outre, le nitrate est goitrogénique chez plusieurs espèces dont les mammifères (bétail : mouton, porcs, chèvre, ...) et le rat (OMS 2004; Vermeer et van Maanen 2001).

### 2.5.3 Toxicité chronique

L'inhibition de la croissance a été observée chez des rats après 2 ans d'exposition à une diète contenant 5% et plus de  $\text{NaNO}_3$ . Une NOEL correspondant à 1% de la dose (soit 370 mg/kg.jour) a été déduite de cette étude. Les effets les plus reportés suite à l'exposition de rats au nitrite pendant 2 ans étaient l'augmentation des niveaux de méthémoglobinémie et des changements histopathologiques dans les poumons et le cœur. Une NOEL = 10 mg  $\text{NaNO}_2$ /kg.jour a été déduite. L'exposition au nitrite a aussi provoqué une déficience en vitamine A chez plusieurs espèces animales (OMS 2004).

### 2.5.4 Mutagénicité et génotoxicité

Le nitrate n'est pas mutagénique pour les bactéries et les cellules de mammifères *in vitro* (Santé Canada 1987). Il n'y a pas d'association entre nitrate dans l'eau et la fréquence d'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes périphériques chez l'humain qui ait été observée (Kleinjans et al. 1991). En effet, dans une étude portant sur des enfants exposés à l'eau potable dont les concentrations de nitrates excédaient 70 mg N/L, on n'a pas observé d'échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes (IARC 1998).

Par contre le nitrite lui, est mutagénique dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*. Il a provoqué des lésions cytogénétiques *in vivo* chez le rat, la souris et le lapin, et *in vitro* dans les cellules BSC-1 et Hela (Luca et al. 1987). Il est aussi mutagénique sur les cellules d'embryons de hamsters dorés de Syrie et les souches TA1537 de *Salmonella typhimurium* (Santé Canada 1987).

### 2.5.5 Cancérogénicité

Le nitrate n'est pas cancérigène chez les animaux testés. Plus précisément, nitrate et nitrite administrés seuls ne se sont pas révélés cancérigènes chez les animaux testés (OMS 2004; Lijinsky et al. 1983; Mirvish et al. 1980). Cependant le nitrite l'était si administré en même temps que des composés nitrosables, suggérant que l'effet soit dû à la formation endogène de NOC cancérigènes. C'est alors que plusieurs études réalisées chez les rongeurs ont testé l'effet du nitrite en combinaison avec des amines secondaires, tertiaires ou des amides spécifiques, dans la diète, dans l'eau potable ou par gavage.

Plusieurs de ces combinaisons ont entraîné une augmentation de l'incidence de tumeurs par rapport à l'administration individuelle d'amine, d'amide ou de nitrite. Parmi les amines et amides ayant causé des résultats positifs on peut citer: la n-dibutylamine, la n-methylaniline, la piperazine, la morpholine, la butylurée, l'éthylurée, l'éthylthiourée, la méthylurée, l'aminopyrine, la bis (2-hydroxypropyl) amine, la diphénylamine, le disulfiram, ... Les tumeurs étaient entre autres: gastrique, hépatiques, pulmonaires, des lymphomes malins, des tumeurs du pré-estomac, des papillomes de la vessie urinaire, des adénocarcinomes utérins,...

Suite aux résultats d'études animales, une association entre le couple (nitrate/nitrite) et le cancer *via* la formation de NOC est suspectée depuis lors (IPCS 1999; Grosse et al. 2006; Fan et Steinberg 1996). Ceci dit, au moins 75% des 120 NOC testés chez les animaux se sont révélés être cancérigènes chez ceux-ci (OMS 2004). C'est donc compte tenu de la possibilité qu'il forme des NOC que le couple nitrates/nitrites a été classé comme étant probablement cancérigène dans les conditions de nitrosation endogène (2A) (Grosse et al. 2006).

### **2.5.6 Effets sur la reproduction et le développement**

Aucun effet n'a été reporté chez le lapin et le bétail concernant le nitrate. Cependant, des troubles de la reproduction ont été reportés chez le cobaye aux concentrations très élevées de nitrate de potassium (30 000 mg  $\text{KNO}_3/\text{L}$ ) avec une NOEL = 10 000 mg  $\text{KNO}_3/\text{L}$  (OMS 2004).

Pour ce qui est du nitrite, il est capable de traverser la barrière placentaire et de causer la méthémoglobinémie chez les rats femelles (OMS 2004). Les données expérimentales ont démontré une reprotoxicité et des effets sur le développement qui sont majoritairement associés à l'exposition aux concentrations très élevées capables d'induire la méthémoglobinémie maternelle (OEHHA 1997). Ainsi ni la foetotoxicité, ni l'augmentation du taux de méthémoglobinémie maternelle, ni d'embryotoxicité n'ont été observés chez le rat exposé à des doses de l'ordre de 200 et 300 mg  $\text{NaNO}_2/\text{Kg.jour}$  administrées dans l'eau. Les effets comportementaux et sur la fonction surrénalienne observés ont été attribués à l'hypoxie fœtale causée par une méthémoglobinémie sévère chez les rats femelles enceintes (IPCS 1999; OEHHA 1997). Chez les bébés de rats

femelles ayant consommé 2000 ppm de NaNO<sub>2</sub> dans l'eau potable, des effets sur le développement ont été observés (OEHHA 1997; Nyakas et al. 1994).

Aucun effet tératogène des nitrates et nitrites n'a été reporté chez le rat, la souris, le hamster et le lapin (IPCS 1999; Santé Canada 1987; OMS 2004; ATSDR 2007; OEHHA 1997; IARC 1998).

## 2.6 Effets sur la santé humaine

### 2.6.1 Méthémoglobinémie

Le principal effet toxique aigu associé à un empoisonnement de nitrates et de nitrites chez l'humain est la méthémoglobinémie. L'organe cible principal est le sang.

Ceci dit, le fer de l'hémoglobine (Hb) du sang peut se retrouver sous deux formes principales : la forme ferreuse ou réduite Fe<sup>2+</sup> et la forme ferrique ou oxydée Fe<sup>3+</sup>. L'oxyhémoglobine (oxyHb) dans laquelle le fer de l'Hb se retrouve sous sa forme réduite Fe<sup>2+</sup> est capable de transporter l'oxygène (O<sub>2</sub>) ou le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ce qui n'est pas le cas de la méthémoglobine (metHb), qui elle, est une forme d'Hb dans laquelle le fer est présent sous sa forme oxydée Fe<sup>3+</sup>. Ainsi, une fois dans la circulation sanguine, les nitrites issus de la transformation des nitrates oxydèrent le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) de l'oxyhémoglobine des globules rouges en fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) de la méthémoglobine selon la réaction suivante <sup>6</sup>:



C'est la metHb qui est à l'origine de la méthémoglobinémie. Plus précisément, elle exerce sa toxicité de deux façons. Premièrement, elle réduit les capacités du sang à transporter l'O<sub>2</sub> qu'elle lie fortement, l'empêchant de se dissocier. De cette façon, elle empêche que l'O<sub>2</sub> soit livré aux tissus. Deuxièmement, en interférant avec la dissociation de l'O<sub>2</sub>, elle déplace la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine vers la gauche (IPCS 1999; IARC 1998; Swissa et al. 2007).

Dans les conditions physiologiques normales, il existe constitutionnellement de faibles niveaux de méthémoglobine (0,5 à 2,0%) (OEHHA 1997). D'un autre côté, il

---

<sup>6</sup> Tiré de : OMS (2004).



existe plusieurs systèmes endogènes chargés de maintenir l'hémoglobine dans son état réduit. C'est pourquoi chez un individu normal, environ 1% de l'hémoglobine totale se retrouve sous forme méthémoglobine à tout moment. Cette dernière peut être réduite en hémoglobine par les deux méthémoglobine réductases : NADH-dépendant (majoritairement) et NADPH-dépendant (à un moindre degré) (ATSDR 2007).

Dépendamment du pourcentage de la méthémoglobine totale, le tableau clinique se présentera comme suit :

Taux de méthémoglobinémie (%)	Manifestations cliniques
≤ 10	Du fait de la grande capacité du sang à transporter l'oxygène, en général, pas de signes cliniques associés
10 – 20	Cyanose : bleuissement des lèvres, de la peau des membres et du tronc, habituellement asymptomatique
20 – 45	Dépression du système nerveux central (céphalées, étourdissements, fatigue, léthargie, syncope), troubles circulatoires (dyspnée/tachypnée, arythmies cardiaques)
45 – 55	Aggravation du niveau d'inconscience
55 – 70	Coma, convulsions, choc, arythmie
> 70	Risque de décès

**Tableau 3.** Manifestations cliniques dues au taux de méthémoglobinémie dans le sang<sup>7</sup>

La population cible principale de ce risque est constituée par les nourrissons de moins de 3 mois (OEHHA 1997). En effet, plusieurs cas de méthémoglobinémie ont été reportés dans cette population lorsque les concentrations de nitrates dans l'eau utilisée pour la préparation des biberons excédaient 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (IPCS 1999).

<sup>7</sup> Le tableau a été conçu à partir des données de : OMS (2007); US EPA (2002a); Phaneuf et al. (2004) et ATSDR (2007).

En outre, le risque est particulièrement élevé chez les enfants exposés à une eau qui connaît une contamination microbiologique susceptible d'augmenter les concentrations gastro-intestinales de nitrites. Les enfants sont aussi particulièrement susceptibles car : 1) leur pH gastrique plus élevé permet une prolifération plus importante de leur flore bactérienne intestinale, et donc des niveaux de nitrites plus élevés; 2) ils possèdent une faible capacité enzymatique à réduire la méthémoglobinémie en hémoglobine, 3) et finalement, ils possèdent l'hémoglobine fœtale (hémoglobine F) qui est plus facilement oxydée que celle de l'adulte (OEHHA 1997).

Chez les femmes enceintes, les concentrations de méthémoglobine (0,5 à 2,5% de l'hémoglobine totale se trouve normalement sous forme de méthémoglobinémie) peuvent augmenter jusqu'à des maximums de 10% dans la 30<sup>e</sup> semaine de grossesse. Ces niveaux rentrent cependant à la normalité aussitôt après l'accouchement. Compte tenu de cela, les femmes enceintes constituent alors une autre population cible de la méthémoglobinémie et devraient s'assurer de la qualité de leur eau durant la grossesse (IPCS 1999).

En plus des enfants et des femmes enceintes, les autres populations les plus susceptibles à la méthémoglobinémie sont les personnes déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase (Swissa et al. 2007) ou en méthémoglobinémie réductase, les adultes avec une acidité gastrique réduite (par exemple par l'achlorhydrie ou l'atrophie gastrique) (OMS 2004; OEHHA 1997).

Des cas cliniques de méthémoglobinémie chez des adultes ayant consommé de l'eau contaminée par les nitrates n'ont pas été reportés. Cependant il y a eu des cas d'intoxication après ingestion accidentelle de doses élevées de nitrates ou lors de traitements. Les doses toxiques variaient de 33 à 150 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$  et les doses létales de 67 à 833 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ .

Pour ce qui est des nitrites, des cas d'intoxications accidentelles suite à l'ingestion d'aliments contaminés par les nitrites ont été reportés. Les doses létales variaient de 33 à 250 mg  $\text{NO}_2^-/\text{kg}$ , les doses faibles s'appliquant aux personnes âgées et aux jeunes enfants. Pour ce qui est des doses toxiques, elles variaient de 0,4 à 200 mg  $\text{NO}_2^-/\text{kg}$ . Le

nitrite de sodium utilisé comme vasodilatateur ou antidote de l'empoisonnement au cyanure a aussi été impliqué dans des cas d'intoxication au nitrite (OMS 2004).

Par ailleurs, outre les nitrates, plusieurs médicaments peuvent induire la méthémoglobine : benzocaïne, sulfamidé, dapsone,... (Phaneuf et al. 2004).

Soulignons que les rongeurs ne constituent pas de bons modèles pour étudier ce risque. En effet, la méthémoglobinémie est due aux nitrites et en présence de nitrates, une réduction préalable de ceux-ci en nitrites est nécessaire pour induire l'effet toxique. Or plusieurs espèces ne possèdent malheureusement pas de bactéries réductrices de nitrates.

### **2.6.2 Effets sur la reproduction et le développement**

L'exposition de la mère aux nitrates et nitrites environnementaux pourrait augmenter les risques de complications lors de la grossesse tel que : avortements spontanés, restrictions de la croissance intra-utérine, déformations variées à la naissance, travail difficile, pré-eclampsie, défauts du tube neural (Brender et al. 2004), naissance prématurée, faible poids à la naissance, anencéphalie, défaut du système nerveux central, malformations congénitales pouvant causer la mort (OMS 2007; Ward et al. 2007) et effets comportementaux (IARC 1998).

Pour ce qui est des effets sur le développement de la progéniture (aussi embryon et/ou fœtus), les études épidémiologiques récentes suggèrent la possibilité d'une association entre ceux-ci et l'ingestion d'eau à teneur élevée de nitrates par la mère; toutefois, aucune conclusion claire sur la relation de cause à effet n'a pu être établie (OEHHA 1997; INSPQ 2003). C'est alors qu'une association entre l'ingestion de nitrates dans l'eau et des malformations congénitales (particulièrement celles du tube neural) a été suggérée (van Grinsven et al. 2006). En outre, selon l'OEHHA (1997), un seul rapport datant de 1997 et portant sur les cas d'avortements spontanés et les nitrates dans l'eau a été identifié depuis l'établissement des standards de nitrate dans l'eau potable (début 1990). Dans ce rapport, les cas étaient des femmes résidant en Inde et les niveaux de nitrates dans les puits étaient de l'ordre de 19 à 29 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Cette étude n'a malheureusement pas pu elle aussi établir une relation causale entre nitrates dans l'eau et avortements spontanés.

Compte tenu des limites des données disponibles, il apparaît donc évident que plus d'études soient nécessaires pour évaluer les effets de ces substances sur le développement et la reproduction humains.

### 2.6.3 Cancer

Le rôle des nitrates et nitrites dans l'étiologie du cancer chez l'humain, particulièrement celui de l'estomac, a été révisé et discuté dans plusieurs études (Grosse et al. 2006; Walker 1990; Forman 1989). La conclusion tirée notamment sur la base d'études animales est que le couple nitrates/nitrites est «probablement cancérigène pour l'humain dans les conditions de nitrosation endogène (groupe 2A)» (Grosse et al. 2006). Ainsi, plusieurs études épidémiologiques ont investigué la relation entre les fréquences de cancer et l'ingestion de nitrates (*via* l'eau ou les aliments). Les résultats de celles-ci sont dans l'ensemble très équivoques. Certaines études épidémiologiques ont observé une augmentation du risque de cancer chez des individus qui, même si les niveaux actuels de nitrates dans leur eau étaient inférieurs à la norme, ils avaient utilisé l'eau de réseaux publics avec des concentrations élevées de nitrates pendant plusieurs décennies. Dans une étude cas/témoin réalisée au Nébraska, on a observé des associations entre des niveaux élevés de nitrates ( $> 50$  ppm) dans l'eau potable de réseaux publics et des risques élevés de lymphomes non-Hodgkinien, mais aucune relation cause/effet n'a pu être démontrée (Ward et al. 1996). Une association a aussi été plausible entre le cancer du colon et l'ingestion de nitrates *via* l'eau potable particulièrement chez les individus qui consomment peu de fruits et légumes (De Roos et al. 2003). Des associations ont aussi été notées pour les cancers de la vessie urinaire et des ovaires (Weyer et al. 2001). Deux études de (Morales Suarez-Varela et al. 1993,1995) ont évalué l'impact des concentrations élevées de nitrates dans l'eau (plus de 50 mg N/L) sur l'incidence de cancer et la mortalité à Valence, Espagne. Les auteurs ont suggéré une association possible entre les concentrations élevées de nitrates dans l'eau potable et les cancers de la vessie et de l'estomac. Cependant encore, aucune relation cause/effet claire n'a pu être démontrée.

Par ailleurs, d'autres études ont reporté une relation inverse entre les nitrates dans l'eau et les cancers utérin et rectal (Weyer et al. 2001). C'est aussi le cas d'une étude

cas/témoins menée en Allemagne qui a conclu en l'absence d'une association entre les niveaux faibles de nitrates dans l'eau potable (quartile supérieur > 5,7mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) et le risque de cancer du cerveau (Steindorf et al. 1994). De même, il n'y a pas eu d'évidence d'une association entre cancer du pancréas et nitrates dans l'eau potable à des niveaux inférieurs ou égaux à la CMA (plus précisément  $\geq 7,5$  ou 10 mg N/L) dans une étude menée en Iowa (Coss et al. 2004). Pas d'association non plus entre nitrates dans l'eau et risque de carcinomes des cellules rénales dans une population de femmes âgées de l'Iowa (Ward et al. 2007).

De façon générale, il n'existe pas d'évidence épidémiologique d'une relation causale entre cancer et nitrates dans l'eau à des concentrations atteignant 45 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (soit 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) et souvent même plus. Cependant, à cause du fait que les données disponibles ne soient pas toujours adéquates, l'existence d'une association ne saurait être exclue.

#### **2.6.4 Autres effets**

L'exposition chronique aux nitrates pourrait causer une diurèse, l'hémorragie de la rate (U.S.EPA 2006). Des études épidémiologiques suggèrent aussi une association possible entre les nitrates dans l'eau potable et le diabète mellitus insulino-dépendant de type 1 chez l'enfant (ATSDR 2007; Vermeer et van Maanen 2001), les problèmes thyroïdiens, l'hypertension et les maladies chroniques chez les enfants (infections des voies respiratoires, diarrhée, gastrite) (U.S.EPA 2006). Ainsi, l'augmentation de l'incidence du goitre (hypertrophie de la thyroïde) a été observé chez des individus ayant consommé de l'eau avec des concentrations de nitrates dépassant 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (OMS 2004; van Maanen et al. 1994; Vermeer et van Maanen 2001). De même, des effets sur la sécrétion des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales ont été rapportés (OMS 2004).

De par les propriétés vasodilatatrices du nitrite, ses composés inorganiques et organiques peuvent produire l'hypotension chez l'homme par action directe sur les muscles lisses (IPCS 1999; OEHHA 1997; van Grinsven et al. 2006). À cet effet, des doses thérapeutiques de 30 à 60 mg de nitrite de sodium sont typiquement utilisées pour traiter l'angine de poitrine. L'hypotension peut aussi être causée par le nitrate organique,

bien que ce soit par un mécanisme d'action indirecte; ce qui n'est pas le cas du nitrate inorganique qui lui ne produit aucun effet (IPCS 1999; OEHHA 1997). Tous ces effets semblent particulièrement marqués pour le nitrate dans l'eau comparé à celui dans la diète, et ce surtout dans les cas de déficience simultanée en iode (OMS 2004).

Enfin, des effets indirects sur la santé pourraient survenir comme conséquence de la contamination de l'eau par les nitrates. En effet, dans l'eau, les nitrates pourraient mobiliser des éléments toxiques s'y retrouvant sous forme de traces (ex. Nickel, cobalt, arsenic) en oxydant les métaux qui les contiennent. Soulignons que les individus ayant des maladies cardiaques ou pulmonaires seraient plus susceptibles aux effets toxiques du nitrate du fait de leur acidité gastrique réduite. Ceci a été appuyé par des études animales dans lesquelles des changements hématologiques et pathologiques du cœur et des poumons ont été démontrés (OMS 2007).

## 2.7 Normes et recommandations<sup>8</sup>

Du fait de l'ambiguïté des résultats d'études épidémiologiques sur le cancer, toutes les normes et recommandations actuelles n'ont été établies que sur la base des résultats des études épidémiologiques sur le risque de méthémoglobinémie. Ces standards sont censés protéger adéquatement les populations les plus sensibles que sont les nourrissons de moins de 3 mois, de l'apparition de méthémoglobinémie.

Ainsi, deux études principales ont largement documenté les cas de méthémoglobinémie chez l'enfant: celles du groupe de Bosch en 1950 et celle de Walton en 1951 (OEHHA 1997; U.S.EPA 2002a). Cependant, du fait qu'elle présente des données plus complètes de concentrations de nitrates dans l'eau, c'est celle de Walton qui a été retenue. Elle constitue donc la base de l'établissement des normes actuelles de nitrates/nitrites dans l'eau. Il s'agit d'une vaste étude épidémiologique descriptive portant sur l'incidence de méthémoglobinémie chez des enfants ayant régulièrement consommé des préparations faites à base d'eau contaminée par des nitrates. Tous les cas de méthémoglobinémie répertoriés dans 37 états américains ont été analysés dans cette

---

<sup>8</sup> Les concentrations de nitrates et nitrites dans l'eau peuvent être exprimées sous forme nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrates + nitrites ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) ou sous forme poids d'azote de ces ions respectifs. Ainsi,  $1 \text{ mg NO}_3^-/\text{L} = 0,226 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$  et  $1 \text{ mg NO}_2^-/\text{L} = 0,304 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ .

étude et ce, sans égards à la source d'eau ou à la durée d'utilisation. Les concentrations variaient de 10 à 100 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Aucun cas n'avait été observé pour des niveaux inférieurs ou égaux à 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Ainsi, de cette étude une concentration sans effet nocif observé (NOAEL) de 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L a été dérivée. Plusieurs autres études ont appuyé par la suite cette NOAEL pour la méthémoglobinémie infantile (OEHHA 1997; U.S.EPA 2002a).

### **2.7.1 Doses journalières acceptables (DJA)**

Le comité américain d'experts pour les additifs alimentaires (Joint Expert Committee on Food Additives – JECFA) de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) a statué sur une dose journalière acceptable (DJA) de nitrates de 0 à 3,7 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg.jour. Cette dernière a été établie sur la base d'une NOAEL de 370 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg.jour (soit 83,5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg.jour) dérivée d'une étude chronique chez le rat et à laquelle on a affecté un facteur de sécurité de 100 (OMS 2007; ATSDR 2007; Vermeer et van Maanen 2001). Cette dose serait sécuritaire à la fois pour les enfants et les adultes. C'est la même chose pour la dose de référence (RfD) des nitrates de l'EPA qui est de 7 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg.jour (soit 1,6 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg.jour). Une DJA de 0 - 0,07 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg.jour a été établie pour les nitrites (Vermeer et van Maanen 2001). L'EPA a statué sur une RfD de nitrites de 0,33 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg.jour (soit 0,1 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/kg.jour) (ATSDR 2007). Rappelons que ces doses seraient sécuritaires à la fois pour les enfants et les adultes et ne s'appliquent pas aux nourrissons de moins de 3 mois, qui constitue la sous population la plus sensible au risque de méthémoglobinémie (OMS 2004).

### **2.7.2 Normes québécoises**

Le règlement sur la qualité de l'eau potable du Québec prévoit une norme de 10 mg N- (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)/L lorsque les nitrates et les nitrites sont dosés simultanément. Cependant, lorsque les nitrites sont mesurés séparément des nitrates, leurs concentrations ne doivent pas excéder 1 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Gouvernement du Québec 2001; INSPQ 2003).

### 2.7.3 Recommandations canadiennes

Santé Canada a établi une concentration maximale acceptable (CMA) de 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (soient 45 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) pour les nitrates et de 1 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (soient 3,2 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L) pour les nitrites lorsqu'ils sont dosés séparément (Santé Canada 1987). Pour ce qui est des nitrites, un facteur d'incertitude de 10 a été appliqué à la NOAEL considérant que les nitrites ont un potentiel dix fois plus élevé que les nitrates dans l'induction de la méthémoglobinémie. Ces CMA découlent elles aussi de la revue des cas de méthémoglobinémie de Walton et correspondent sans d'autres modifications à la concentration à laquelle aucune incidence de méthémoglobinémie n'a été observée chez les nourrissons. Ces recommandations s'appliquent autant aux enfants qu'aux adultes car Santé Canada a préféré être prudent en minimisant l'exposition aux nitrates de la population en général, étant donné le lien possible entre cancer et concentrations modérées de nitrates dans l'eau potable.

### 2.7.4 Normes américaines

En plus de l'étude de Walton de 1951, les normes américaines reposent aussi sur celle de (Fan et al. 1987). Ces deux études soutiennent que 10 mg N/L protège adéquatement les jeunes enfants de la méthémoglobinémie mais également des effets toxiques potentiels pré et post-nataux des nitrates (INSPQ 2003). Sur la base de celles-ci, l'EPA a fixé la norme des nitrates dans l'eau à 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Malgré les données limitées sur la toxicité des nitrites, on a estimé que ceux-ci étaient 10 fois plus toxiques que les nitrates et un facteur d'incertitude égal à 10 a été retenu. En utilisant la NOAEL de 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L de l'étude de Walton et ce facteur d'incertitude de 10, la norme de 1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L a été fixée pour les nitrites. Finalement, une norme combinée 10 mg N-(NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)/L a été retenue afin de prendre en compte la possibilité d'une toxicité additive de ces deux substances (INSPQ 2003).

### 2.7.5 Critères de l'OMS

Les valeurs guides fixées par l'OMS reposent sur les mêmes considérations que celles retenues par l'US EPA. Ainsi, pour ce qui est des nitrates, la valeur guide a été fixée à 11,3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (soient 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Estimant égal à 10 le potentiel relatif des nitrites à induire la méthémoglobine par rapport aux nitrates (sur une base molaire),



une valeur guide provisoire de 0,9 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (soient 3 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L) a été statuée pour les nitrites dans l'eau. Par ailleurs, compte tenu de l'effet additif des nitrates et des nitrites dans l'eau, l'OMS considère que la somme des ratios de concentrations mesurées de chaque substance par rapport à sa valeur guide ne doit pas excéder l'unité (OMS 2004; INSPQ 2003; Vermeer et van Maanen 2001).

## **2.8 Méthodes d'analyse et techniques de traitement**

Au Canada, Santé Canada reconnaît trois méthodes de dosage des nitrates et des nitrites dans les échantillons d'eau. Ces ions peuvent donc être dosés par chromatographie ionique qui consiste à séparer les ions selon leur charge ionique. Leur conversion subséquente en formes acides hautement conductrices permettra de mesurer leur conductivité. La limite de détection (LD) de cette méthode est de 0,1 mg N/L. Il existe aussi la méthode de réduction du nitrate en nitrite par le cadmium ou l'hydrazine pour des concentrations n'excédant pas 45 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Dans ce cas la LD est de 0,04 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Enfin, le dosage peut aussi se faire par une électrode sélective du nitrate dans l'étendue des concentrations allant de 0,5 à plusieurs milliers de mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Santé Canada 1987).

Aux ÉU, l'EPA recommande des mêmes méthodes comparables à celles du Canada. Ainsi, pour ce qui est des nitrates, l'agence approuve la réduction manuelle par le cadmium (LD = 0,01), la réduction automatisée par l'hydrazine (LD = 0,01), la réduction automatisée au cadmium (LD = 0,05), la chromatographie ionique (LD = 0,01) et l'utilisation de l'électrode sélective d'ion (LD = 1). Pour les nitrites, la spectrophotométrie (LD = 0,01), la réduction automatisée au cadmium (LD = 0,05), la réduction manuelle par le cadmium (LD = 0,01) et la chromatographie ionique (LD = 0,004) sont recommandées (U.S.EPA 2002b, 2008).

Au Québec, le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) réalise le dosage simultané des nitrates et des nitrites par la méthode colorimétrique automatisée avec le sulfate d'hydrazine et le NED (N-(1-naphtyl) éthylenediamine dihydrochloride). La limite de détection de cette méthode est de 0,02 mg N/L et le seuil de quantification est de 0,07 mg N/L (INSPQ 2003; CEAEQ 2007).

### **3. CHAPITRE III : PROBLÉMATIQUE, OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE**

### 3.1 Problématique

La présence des nitrates/nitrites dans l'eau potable présenterait plusieurs risques pour les populations exposées : méthémoglobinémie, diabète, effets sur le développement et cancer. Cependant, les normes actuelles ne sont basées que sur le risque de méthémoglobinémie chez l'enfant qui est le plus documenté. Par ailleurs, plusieurs chercheurs considèrent ces normes comme étant trop conservatrices (Avery 1999; L'hirondel et L'hirondel 2002). Mais c'est qu'ils n'ont pas considéré les autres effets chroniques incluant les effets sur la reproduction ou le diabète et le risque de cancer. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées pour étudier la relation entre nitrates dans l'eau et risque de cancer. Compte tenu des limites des études écologiques, nous ne nous attarderons ici qu'aux études épidémiologiques avec données individuelles (cas/témoins ou cohorte) qui essaient d'estimer l'exposition sur le plan individuel.

C'est le cas d'une étude de cohorte prospective menée chez des femmes de l'Iowa (USA) ayant consommé l'eau du même réseau municipal pendant plus de 10 ans. Dans cette étude, la moyenne (calculée sur une période de 33 ans) des concentrations de nitrates dans l'eau de chaque municipalité a été utilisée comme indicateur d'exposition. Les auteurs ont rapporté des augmentations statistiquement significatives des risques de cancer de la vessie ( $RR = 2,83$ ;  $IC_{95} = 1,11 - 7,19$ ) et des ovaires ( $RR = 1,84$ ;  $IC_{95} = 0,88 - 3,84$ ) en lien avec le quartile supérieur sur la moyenne des concentrations de nitrates ( $> 2,46$  mg N- $NO_3^-/L$ ). Ils ont aussi observé des associations inverses avec les cancers utérins et rectaux, de même qu'aucune association avec les cancers du LNH, du colon, du pancréas, du rein, des poumons, de la peau, mais aussi de la leucémie (Weyer et al. 2001). Soulignons que dans cette étude la quantité d'eau et l'historique de la source d'eau consommée n'ont pas été pris en considération.

Dans leur étude menée au Pays-Bas, aussi de type cohorte prospective, van Loon et al (1998) n'ont observé aucune association entre l'augmentation par quintiles des concentrations de nitrates dans l'eau et le risque de cancer gastrique (quintile supérieur =  $3,7$  mg/jour;  $RR = 0,88$ ). Dans cette étude, plusieurs variables dont la vitamine C ont été prises en compte.

Pour ce qui est des études cas/témoins, plusieurs ont essayé d'étudier l'association entre les cancers du LNH (Freeman 2000; Ward et al. 1996; Weyer et al. 2001), du colon et du rectum (De Roos et al. 2003), du pancréas (Coss et al. 2004), de l'estomac (van Loon et al. 1998; Yang et al. 1998), de la vessie (Ward et al. 2003), du cerveau (Steindorf et al. 1994; Ward et al. 2004) et la présence de nitrates dans l'eau de réseaux municipaux.

Ainsi, dans leur étude menée auprès de résidents de l'est du Nébraska (USA), Ward et al. (1996) ont rapporté une augmentation statistiquement significative entre l'augmentation par quartiles des niveaux de nitrates (sur une période d'environ 40 ans) et les risques de LNH. Dans le quartile supérieur de nitrate (4 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L), le RR = 2,0 (IC<sub>95</sub> = 1,1 – 3,6). Cependant pour le même effet, Freeman et al. (2000) n'ont pas noté d'augmentation du risque avec l'augmentation de l'exposition. Soulignons que dans cette étude les concentrations des 3 catégories étaient apparemment beaucoup plus faibles que dans l'étude de Ward et al. (1996). Dans la catégorie la plus élevée (> 1,5 mg/L), le RR = 0,3 (IC<sub>95</sub> = 0,1 – 0,9). De plus, contrairement à l'étude précédente (Ward et al. 1996), les auteurs n'ont pas considéré la consommation d'eau individuelle.

Soulignons que les résultats de Ward et al. (1996), tout comme ceux de Weyer et al. (2001) sur les cancers ovariens et de la vessie, restent intrigant car les augmentations de risque ont été rapportées pour des niveaux inférieurs aux normes actuelles.

Dans une autre étude menée en Iowa, De Roos et al. (2003) n'ont pas noté d'association significative entre l'ingestion à long terme de nitrates de l'eau de réseaux municipaux et les cancers du colon et du rectum. Pour une consommation pendant plus de 10 ans d'eau avec des niveaux de nitrates de plus de 5 mg/L, le RR = 1,2 (IC<sub>95</sub> = 0,9 – 1,6) pour le cancer du colon et RR = 1,1 (IC<sub>95</sub> = 0,7 – 1,5) pour celui du rectum. Cependant, ces associations devenaient significatives seulement pour le cancer du colon dans le sous-groupe d'individus ayant des apports faibles en vitamine C (RR = 2,0; IC<sub>95</sub> = 1,2 – 3,3) et élevés en viande (RR = 2,2; IC<sub>95</sub> = 1,4 – 3,6).

Dans leur étude cas/témoins toujours menée en Iowa, Coss et al. (2004) n'ont pas rapporté d'association entre le risque de cancer pancréatique et l'augmentation par quartiles (quartiles supérieur : > 2,8 mg/L) des concentrations de nitrates (RR = 0,99; IC<sub>95</sub> = 0,64 – 1,5). De plus l'augmentation observée pour la consommation d'eau avec

des concentrations  $\geq 7,5$  mg/L pendant plus de 4 ans n'étaient pas statistiquement significative (RR = 1,2; IC<sub>95</sub> = 0,79 – 1,9).

L'on a aussi étudié le cancer gastrique. Ainsi, pour des niveaux d'exposition plus faibles que ceux dans l'étude de cohorte de van Loon et al. (1998), l'équipe de Yang et al. (1998) a rapporté une association statistiquement significative avec l'exposition aux nitrates de l'eau, mais les concentrations mesurées dans cette étude étaient très faibles (pour  $C \geq 0,45$  mg/L, RR = 1,14; IC<sub>95</sub> : 1,04 – 1,25). Notons que la quantité d'eau consommée n'a pas été considérée dans cette étude.

Pour ce qui est du cancer de la vessie, aucune association n'a été observée chez les femmes. L'association été inversée dans le cas des hommes (Ward et al. 2003).

En outre, certaines études menées au Nébraska (Ward et al. 2004) et en Allemagne (Steindorf et al. 1994) n'ont trouvé aucune association entre la consommation à long terme d'eau de réseaux publics à des niveaux moyens et le cancer du cerveau chez l'adulte.

Bien que les données d'études épidémiologiques soient limitées et équivoques, on a tout de même observé l'augmentation de l'incidence de tumeurs chez les animaux suite à l'administration de nitrosamines, de nitrite et de précurseurs aminés, mais pas lorsque soit le nitrate, soit le nitrite ou les amines étaient administrés seuls (Lijinsky et al. 1983; Mirvish et al. 1980). L'induction des tumeurs a été observée chez toutes les espèces animales testées : rats (Lijinsky 1984; Lijinsky et Reuber 1980; Yamamoto et al. 1989), souris (Mirvish et al. 1975; Greenblatt et al. 1971), hamsters (Ernst et al. 1987; Shank et Newberne 1976). Les tumeurs de divers types ont été induites dans divers organes : foie, poumons, tissu lymphatique, pré-estomac, utérus, oropharynx, œsophage, etc. Aussi, environ 85% des 209 nitrosamines testés chez les animaux se sont révélés être cancérigènes chez ceux-ci (Gangolli et al. 1994; Vermeer et van Maanen 2001; Montesano et Bartsch 1976; Brown 1999). C'est le cas par exemple du NDMA ou du NDEA qui sont classés « probablement cancérigènes pour l'humain (groupe 2A) » par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Brown 1999). Les résultats d'études animales suggèrent une association entre le couple (nitrate/nitrite) et le cancer *via* la formation de composés N-nitrosés dont les nitrosamines (OMS 2007, 2004; Fan et Steinberg 1996). Ceci a d'ailleurs amené le CIRC à classer le couple (nitrate/nitrite)

comme étant « probablement cancérigène dans les conditions de nitrosation endogène (groupe 2A) » (Grosse et al. 2006).

Ainsi suite à son ingestion *via* l'eau potable, 5% de la dose totale de nitrates absorbés seraient transformés en nitrites par la flore buccale (ATSDR 2007; INSPQ 2003; Mirvish 1994; Granli et al. 1989). Une fois dans l'estomac qu'ils atteignent au moyen de la salive, l'acidité gastrique catalyserait la conversion des nitrites en agents nitrosant. Ces derniers « nitroseraient » les amines pour former les nitrosamines cancérigènes d'origine endogène : on parle alors de « nitrosation endogène ». En effet, celle-ci serait responsable de la majeure partie de l'exposition aux NOC : environ 45-75% de l'exposition totale (Jakszyn et Gonzalez 2006; Tricker 1997). De plus, du fait de la réglementation sur les additifs alimentaires et de l'ajout de l'ascorbate aux aliments transformés, les nitrosamines se retrouvent en général sous forme de traces, sinon pas dans les aliments. Ceci explique d'avantage l'importance de la nitrosation endogène dans l'exposition aux NOC cancérigènes. Elle reste malgré tout difficile à circonscrire car, elle intègre plusieurs paramètres qui sont eux-mêmes difficiles à évaluer. Parmi ceux-ci on peut citer : le taux de transformation des nitrates en nitrites, les apports alimentaires en amines, le taux d'inhibition par la vitamine C, ... Pour ce qui est des apports en amines et en vitamine C, le fait que ces paramètres soient largement répandus dans l'alimentation complique d'avantage leur estimation.

Bien que les résultats des études épidémiologiques soient ambigus, ceux d'expérimentations animales démontrent bien l'effet cancérigène des nitrates/nitrites *via* la formation endogène de nitrosamines. Parce que les nitrosamines sont cancérigènes chez les animaux, on anticipe qu'elles le soient aussi chez l'humain. Justement, les mécanismes de biotransformation initiateurs de la cancérogénèse de ces substances (P450 2 E1) se sont révélés similaires entre animaux et humains (Mirvish 1995; Brown 1999). Mais on ne saurait malheureusement tester ces effets cancérigènes directement dans des expérimentations humaines du fait des débats éthiques qu'elles susciteraient. Compte tenu de ces faits donc, il apparaît judicieux de développer des modèles qui permettent d'évaluer la formation endogène des nitrosamines. Une telle approche

permettrait indirectement d'estimer les excès de risque de cancer hypothétiques associés à la présence de nitrates dans l'eau.

Étant donné que les normes actuelles ne sont basées que sur la méthémoglobinémie chez l'enfant, elles ne seraient peut-être pas adéquates pour prévenir ou réduire les risques dus aux autres effets. Ainsi, une telle approche pourrait permettre de prendre en compte le risque de cancer dans l'élaboration des normes qui ne sont malheureusement basées que sur le risque de méthémoglobinémie.

### **3.2 Objectifs**

Le présent projet visait à évaluer le risque cancérigène associé à la présence des nitrates/nitrites dans l'eau potable. De façon plus spécifique, il avait pour but :

- I) d'estimer les concentrations de nitrates dans les divers réseaux de distribution d'eau potable et leur distribution au sein de chacune des régions étudiées,
- II) puis d'estimer les concentrations de nitrites dans l'estomac suite à la transformation par la flore buccale des nitrates ingérés *via* l'eau potable,
- III) d'estimer l'apport quotidien total de chacune des amines spécifiques étudiées, qui sont des précurseurs déterminant dans la formation endogène des nitrosamines,
- IV) d'évaluer l'exposition aux nitrosamines formées dans l'estomac par l'estimation quantitative des doses journalières de chacune d'elles,
- V) et enfin d'estimer quantitativement les excès de risque de cancer hypothétiques pour la population étudiée.

### **3.3 Méthodologie**

La présente évaluation du risque s'est faite suivant la démarche classique de l'analyse du risque qui comprend quatre étapes. Le détail de la démarche se retrouve

dans l'article scientifique compris dans ce document. Ici, après avoir donné un aperçu de la région sur laquelle nous avons basé notre analyse, nous présentons les grandes lignes propres à chaque étape, que nous avons suivies pour réaliser cette évaluation.

### **3.3.1 Territoire à l'étude**

Le territoire étudié dans cette analyse de risque est drainé par des rivières qui font partie d'une liste prioritaire du ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP). Cette liste répertorie les différents cours d'eau de surface dont la qualité est détériorée, en particulier par les concentrations excessives de phosphore. Leurs bassins versants occupent une partie importante du territoire agricole de la province du Québec et regroupent la majorité des producteurs agricoles de la province.

La présente évaluation de risque est basée sur sept régions administratives du Québec (figure 1) à activités agricoles d'élevage intenses, et qui couvrent quelques uns de ces bassins versants. Ces régions sont les suivantes :

Bas-Saint-Laurent (bassins de la rivière Kamouraska)

Capitale-Nationale

Centre-du-Québec (bassin de la rivière Nicolet)

Chaudière-Appalaches (bassins des rivières Boyer, Chaudière et Etchemin)

Estrie (bassin de la rivière Saint-François)

Lanaudière (bassins des rivières L'Assomption et Bayonne)

Montérégie (bassin de la rivière Yamaska)

Le tableau 4 présente certaines caractéristiques des bassins versants choisis.



**Tableau 4.** Caractéristiques des bassins versants des rivières drainant les diverses régions étudiées.

<b>Bassins versants</b>	<b>Territoire drainé (Km<sup>2</sup>)</b>	<b>Aire pour agriculture (%)</b>	<b>Activités d'élevage (UA)</b>
Bayonne	370	207 54% GI; 29% fourrages, 16% IÉ; 1% autres	21190 55% Volaille; 27% bovins; 16% porcins; 2% autres
Boyer	217	130 53% fourrages; 25% IÉ; 21% GI; 1% autres	23670 55% porcins; 39% bovins; 5% volaille; 1% autres
Chaudière	6680	2204 82% fourrages; 11% IÉ; 6% GI; 1% autres	178000 47% bovins; 46% porcs; 5% volaille; 1% autres
Etchemin	1466	440 61% fourrages; 21% GI; 17% IÉ; 1% autres	78219 54% porcins; 33% bovins; 11% volaille; 2% autres
Kamouraska	296	104 70% fourrages; 26% IÉ; 4% GI; 0.1% autres	6199 77% bovins; 18% porcins; 0.2% volaille; 5% autres
L'Assomption	4220	760 63% GI; 23% fourrages; 13% IÉ; 1% autres	61812 52% porcins; 30% bovins; 14% volaille; 4% autres
Nicolet	3400	2040 50% fourrages; 37% GI; 13% IÉ; 0.6% autr.	126423 64% bovins; 27% porcs; 4% volaille; 5% autres
Saint-François	10228	2353 66% fourrages; 21% GI; 12% IÉ; 1% autres	171456 58% bovins; 31% porcs; 6% volaille; 5% autres

UA (unité animale) : correspond au nombre d'animaux équivalent à un bovin adulte en ce qui concerne le rejet d'azote. C'est encore la concentration d'animaux d'élevage/unité de surface. Ainsi, en poids d'un animal d'environ 500 kg : 1 UA ~ 1 vache, 5 porcs, 250 poules. Grand interligne (GI) : principalement le maïs (grain, fourrage), la pomme de terre, le soja et des légumineuses. Ces cultures à risques relativement élevés d'érosion. Interligne étroit (IÉ) : principalement l'avoine (grain, fourragère), l'orge, le blé, le seigle, les céréales mélangées. Les terres ainsi cultivées sont mieux protégées de l'érosion que les terres labourées et les terres en cultures à GI. Fourragères : cultures liées à l'élevage du bétail et au pacage. L'érosion des sols est minimale en raison de la couche d'herbe. Adapté à partir de : <sup>1</sup> (Giroux 2007); <sup>2</sup> : (MIDDEP 2002); <sup>3</sup> : (Pelletier 2005); <sup>4</sup> : (Pelletier 2008); <sup>5</sup> : (Simoneau 2005); <sup>6</sup> : (Ghazal et al. 2006); <sup>7</sup> : (Painchaud 2007); <sup>8</sup> : (COGEBY 2001).

### 3.3.2 Évaluation du potentiel dangereux

Le potentiel dangereux des nitrosamines pour l'humain résulte soit de leur ingestion directe sous forme préformée, soit plutôt de l'ingestion simultanée de nitrates (nitrites) et de précurseurs nitrosables (principalement les amines secondaires) qui peuvent être transformés en nitrosamines dans l'estomac. En effet, pour induire le cancer, nitrates et nitrites nécessitent d'être dans des conditions dites «de nitrosation endogène» (pH acide de l'estomac, présence d'amines, niveaux faibles de vitamine C) (Grosse et al. 2006).

Une revue détaillée de littérature nous a permis d'examiner la capacité de ces substances à induire le cancer. Ainsi, plus de 85% des nitrosamines testées jusqu' alors se sont révélées être cancérigènes chez plusieurs espèces animales (rats, souris, hamsters, cobaye). Plus précisément, l'augmentation de l'incidence de tumeurs associée à l'exposition aux nitrosamines a été observée chez une variété d'espèces animales des deux sexes, soit par exposition orale ou par inhalation, chez les animaux matures et immatures, et suivant différents protocoles expérimentaux. De même plusieurs études animales portant sur l'exposition aux nitrates/nitrites dans l'eau potable en présence de précurseurs nitrosables ont noté l'augmentation de risque de cancer *via* la formation de nitrosamines. Les tumeurs sont en général de plusieurs types et variées (Tableau 5). À priori, tous les organes peuvent être touchés (estomac, œsophage, vessie, cerveau), mais les plus susceptibles sont ceux du tube digestif dont principalement l'estomac et le foie (Mirvish 1995). Le tableau 5 présente quelques études animales de cancérogénicité des nitrosamines.

Du fait de la possibilité d'induction de cancers et implicitement de considérations éthiques, les études d'expérimentation humaine n'ont en général pas pu être menées. Celles qui l'ont été se sont faites généralement dans le but d'évaluer la nitrosation endogène : types de nitrosamines formées et quantités totales. Et pour ce qui est des expositions, celles-ci se faisaient la plupart du temps avec les précurseurs de nitrosamines non cancérigènes dont principalement la N-nitrosoproline. Pour ce qui est des études épidémiologiques, les résultats de celles-ci sont ambigus et équivoques. Bon

nombre d'entre elles sont suggestives et aucune conclusion définitive n'a encore pu être prise quant à la relation dose/effet.

Des efforts ont été faits pour comprendre le processus de cancérogénicité associé aux nitrosamines, particulièrement chez les rats et les souris. Bon nombre d'études soutiennent que la biotransformation des nitrosamines suivie de la méthylation de l'ADN par leurs métabolites et de la formation d'adduits (particulièrement à la position O<sup>6</sup> de la guanine), sont tous des processus qui interviennent dans le mécanisme de cancérogénicité. Par exemple, la formation d'adduits à l'ADN après exposition au NDMA a été détectée *in vitro*. Ce type d'adduits a aussi été détecté dans les cultures tissulaires hépatiques humaines (Herron et Shank 1980). Les études ont aussi démontré que la réparation des adduits O<sup>6</sup>-méthylguanine ou une faille de cette réparation par les O<sup>6</sup>-méthylguanine DNA méthyltransférases (MGMT) interviendrait dans le processus de cancérogénicité.

Bien que très peu d'études expérimentales humaines des nitrosamines existent, la biotransformation de ces substances semble être très similaire à celle des animaux (rongeurs). Ainsi, le même isoforme CYP2E1 du cytochrome P450 intervenant dans le processus métabolique chez les rongeurs a été aussi détecté dans les cellules hépatiques humaines, et il réagit aux anticorps anti-enzyme du rat. Les MGMT, enzymes responsables de la réparation des adduits O<sup>6</sup>-méthylguanine à l'ADN, ont été détectées dans le foie humain. Ainsi donc, il est fort probable que les résultats d'expérimentations animales associés à l'exposition au NDMA soient représentatifs de l'exposition humaine.

### **3.3.3 Caractérisation de la toxicité**

Les relations dose/réponse relatives aux différentes nitrosamines étudiées dans cette analyse de risque ont été réalisées grâce à un grand nombre d'études animales (tableau 5). Ceci dit, les études jugées comme étant les meilleures ont été employées pour décrire une relation dose/réponse spécifique à chacune des sept nitrosamines étudiées. Dans toutes ces études, l'exposition s'est faite *via* l'eau potable.

Tableau 5. Nitrosamines et études animales de cancérogénicité

Études animales			
Nitrosamines	Espèces	Types et sites de tumeurs	Références *
NDBA	Rats BD, rats Wistar mâles, rats Fischer F344; souris C57Bl/6; hamsters Syrian Golden	Carcinomes, papillomes et adénomes; hépatocellulaires, vessie; oesophage; pré-estomac; poumons	Druckrey et al. (1967), Okajima et al. (1971), Lijinsky et Reuber (1983), Imada et Wang (1986); Tsuda et al. (1987), Bertram et Craig 1970, Althoff et al. (1973; 1974)
NMEA	Rats BD femelles, rats Fischer F344 mâles et femelles	Fibrosarcomes du vagin; carcinomes hépatocellulaires, tumeurs de la cavité nasale	Druckrey et al. (1967), Lijinsky et al. (1982)
NPPA	Rats BD, rats Sprague-Dawley; rats Fischer F344	Carcinomes (hépatiques, oesophagiens et du pré-estomac); papillomes oesophagiens; adénocarcinomes nasaux, tumeurs de la langue	Druckrey et al. (1967), Lijinsky et Taylor (1978, 1979); Lijinsky et Reuber (1981)
NDEA	Rats Colworth mâles et femelles; rats Fischer F344 femelles; rats Sprague-Dawley mâles; hamsters, cochons d'Inde, lapins, chien, singes	Carcinomes (langue, oesophage, foie); papillomes (oesophage, pré-estomac); cancers (oesophage, intestine, pré-estomac, rein, ovaires, vésicules séminales et nasopharynx)	Peto et al. (1982, 1984); Lijinsky et al. (1981); Habs and Schmahl (1980); Yamamoto et al. (1972); Druckrey et al. (1967); Magee et al. (1976); Rajewski et al. (1966); Tomatis (1973)
NDMA	Rats MRC Porton mâles et femelles; souris B6B/C <sub>3</sub> H <sub>1</sub> /c femelles; rats Wistar; souris C57Bl; rats Colworth; rats Fischer F344; rats BD	Tumeurs (hépatiques, pulmonaires, rénales, vésicules séminales, cellules de Leydig, tissu lymphatique); hémangiosarcomes; neuroépithéliomes olfactifs du cerveau	Terracini et al. (1967); Terracini et al. (1973); Terao et al. (1978); Arai et al. (1979); Cincute et al. (1981); Peto et al. (1982, 1984); Lijinsky et Reuber (1984); Druckrey et al. (1967); Moiseev et Benemansky (1975)
NPIP	Souris ICR; rats Sprague-Dawley; hamsters Syrian Golden; singes Cynomolgus et rhésus	Carcinomes (oesophage, pré-estomac, cholangiques, hépatocellulaires); tumeurs hépatiques; adénomes (pulmonaires, hépatocellulaires); hémangioendothéliomes; tumeurs voies respiratoires (polytypes papillaires, papillomes et carcinomes épidermoïdes du pharynx et de la trachée)	Takayama (1969); Eisenbrand et al. (1980); Adamson et Sieber (1982); Ketter et al. (1983)
NPYR	Rats DB; rats MRC; souris Swiss; rats Sprague-Dawley	Carcinomes hépatocellulaires; mésothéliomes papillaires des testicules	Druckrey (1967); Greenblatt et Lijinsky (1972a); Greenblatt et Lijinsky (1972b); Lijinsky et Taylor (1976); Preussman et al. (1977)

Adapté à partir de la revue des études présentées dans le guide de l'OEHA, CalEPA. \* Les références présentées ici sont disponibles en intégralité dans le guide (OEHA 2005). NDMA: N-nitrosodiméthylamine; NDEA: N-nitrosodiméthylamine; NDBA: N-nitrosodiméthylamine; NPPA: N-nitrosopropylamine; NDEA: N-nitrosodiméthylamine; NDMA: N-nitrosodiméthylamine; NPIP: N-nitrosopipéridine; NPYR: N-nitrosopyrrolidine.

Rappelons que la réponse dans ce contexte précis est l'augmentation du nombre de tumeurs par rapport aux témoins. Ainsi à partir des études sélectionnées, une relation dose/réponse spécifique à chacune des sept nitrosamines étudiées a pu être ajustée. Ces relations sont typiques de tumeurs spécifiques à des sites individuels et chez les espèces les plus sensibles. Compte tenu du fait que les études animales sont normalement conduites avec des doses très élevées et supérieures à celles de l'exposition humaine, des procédures d'extrapolation aux doses faibles ont été utilisées. La procédure de linéarisation en étapes multiples (LMS) de l'EPA (adoptée par le CalEPA) a donc été utilisée pour la majorité des nitrosamines (NDBA, NDMA, NDEA, NPYR). Sinon ce fût plutôt d'autres modèles comme le modèle one-hit (NMEA, NPPA) qui furent employés. Après l'extrapolation, un facteur de pente  $q_1$  a été ajusté à chacune des sept relations doses/réponse retenues. L'IC<sub>95</sub> de cette pente, appelé  $q_1^*$  est considérée comme étant la limite supérieure du potentiel de chaque nitrosamine à induire le cancer. Considérant la variabilité inter-espèces chez les animaux, un ajustement a été fait pour estimer le potentiel cancérigène de chaque nitrosamine chez les animaux :  $q_{\text{animal}}$ .

Même si les études animales utilisées sont bien conduites, il y a toujours de l'incertitude associée à l'utilisation de résultats d'expérimentations animales. Dans la mesure du possible et si on le juge approprié, les renseignements concernant la pharmacocinétique, le métabolisme et les mécanismes de la cancérogénicité et de la mutagénicité sont intégrés aux estimations quantitatives du potentiel cancérigène, surtout lorsqu'elles sont obtenues à partir d'études animales. Ceci permet une estimation pertinente du potentiel cancérigène pour les populations humaines. Ceci dit, même si les nitrosamines sont généralement métabolisées de façon similaire entre les animaux (rats) et les humains (CYP2E1), il subsiste quand même quelques différences dans le métabolisme entre ces deux espèces. En effet, les humains semblent avoir un niveau basal de l'enzyme MGMT plus élevé que chez le rat, suggérant des différences de susceptibilité. Ainsi, d'autres ajustements ont permis par la suite d'estimer le potentiel de chaque nitrosamine à induire le cancer chez les populations humaines :  $q_{\text{humain}}$ .

Le tableau 2 donne un aperçu des études ayant permis le calcul des  $q_{\text{humain}}$  utilisés dans cette analyse de risque.

### 3.3.4 Estimation de l'exposition de la population

En général, en plus de l'état de santé des individus, le fait que beaucoup de facteurs pouvant avoir une influence sur l'exposition soient largement répandus dans la diète complique son évaluation. Cependant dans le présent contexte, elle fut d'autant plus ardue compte tenu de la confusion ayant lieu à la base. En effet, nous avons affaire ici à une exposition directe aux nitrates (pas les nitrites, vu qu'ils sont présents en faible quantité dans l'eau potable), sources incontournables de nitrites qui sont déterminants dans la formation des nitrosamines; et une exposition indirecte aux nitrosamines, substances responsables du cancer. Ainsi, l'évaluation de l'exposition aux substances cancérigènes que sont les nitrosamines s'est faite en deux étapes. La première étape fut l'évaluation de l'exposition aux nitrates de l'eau dans les régions étudiées. Ainsi, celle-ci s'est faite à partir des mesures de concentrations de nitrates dans les réseaux municipaux des 7 régions étudiées qui sont alimentés en eau souterraine. Ces données de concentrations nous ont été fournies par le ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP). Grâce au tableur Excel 2004, des statistiques descriptives (distributions) ont donc été dérivées de ces données pour chacune des sept régions.

Pour ce qui est de l'exposition aux nitrosamines, nous l'avons évalué indirectement en considérant un scénario de transformation complète des nitrites (issus de la transformation d'une fraction des nitrates de l'eau) et de diverses amines de l'alimentation en nitrosamines spécifiques : diméthylnitrosamine (NDMA), diéthylnitrosamine (NDEA), N-n-dibutylnitrosamine (NDBA), N-méthyléthylamine (NMEA), N-nitroso-n-propylamine (NPPA), N-nitrosopipéridine (NPIP), N-nitrosopyrrolidine (NPYR).

L'exposition fut donc estimée grâce à un modèle mathématique intégrant les paramètres : concentrations de nitrates, volume d'eau, taux de transformation, quantités totales d'amines consommées. Une approche probabiliste a été utilisée afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle de chacun de ces paramètres (hors mis les concentrations de nitrates) au sein de la population de la zone étudiée. Ainsi, des simulations Monte Carlo effectuées grâce au logiciel Crystal Ball (Crystal Ball ®,

Decisioneering Inc., Colorado), ont permis d'estimer des distributions de chacun des paramètres au sein de la population étudiée, et ce à partir de leurs composantes paramétriques (moyenne, déviation standard, 95<sup>e</sup> centile,...) recensées dans la littérature. Cette étape n'était pas requise pour le paramètre «concentrations de nitrates dans l'eau» puisque nous les avons déjà, comme mentionné plus haut. Par la suite la combinaison de ces paramètres dans un modèle nous a permis d'estimer la distribution au sein de la population de l'exposition à chacune des nitrosamines étudiées comme suit :<sup>9</sup>

$$DEJ_{nitros} = \frac{[NO_2^-]^2 \times AQT_{am} \times K \times 3600 \times PM_{nitros}}{PC}$$

$$\text{Avec: } [NO_2^-] = \frac{[NO_3^-] \times TR \times TI_e}{V_s}$$

et:

$$AQT_{am} = \frac{([a \text{ min } e]_{alt} \times TI_{alt})_i + ([a \text{ min } e]_{alt} \times TI_{alt})_j + \dots + ([a \text{ min } e]_{alt} \times TI_{alt})_n}{PM_{am}}$$

D'où  $DEJ_{nitros}$  (mg/jour): dose d'exposition endogène journalière à chacune des nitrosamines individuelles;

$[NO_2^-]$  (mol/L): concentration des nitrites dans l'estomac après transformation des nitrates;

<sup>2</sup>: car la formation d'1 molécule de  $N_2O_3$  nitrosant requiert 2 molécules de  $NO_2^-$

$AQT_{am}$  (mg/jour): apport quotidien total en chacune des amines individuelle;

$K$  ((mol/L)<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>): constante de nitrosation spécifique à chaque amine;

3600: équivalent à 1 heure, correspond au temps estimé durant lequel les précurseurs restent en concentrations constantes;

$PM_{nitros}$ : poids moléculaire de chaque nitrosamine individuelle;  $PC$ : poids corporel estimé à 70 kg pour un adulte moyen;  $[NO_3^-]$  (mol/L): concentration de nitrates dans l'eau;  $TR$  (%): taux de transformation estimé varier de 5 à 30%;  $TI_e$  (L/jour): taux d'ingestion d'aliment spécifique;  $V_s$  (L): volume de l'estomac estimé être égal à 05 L

<sup>9</sup> Modèle initialement mis au point par Shephard (1987), puis adapté par Phaneuf et al. (2004).

$AQT_{am}$  (mg/jour) : apport quotidien total en l'amine spécifique, précurseur de la nitrosamine d'intérêt

$[Amine]_{alt}$  (mg/kg d'aliment spécifique): concentration d'amine spécifique dans un aliment spécifique;  $TI_{alt}$  (mg/jour): taux d'ingestion d'aliment spécifique

$PM_{am}$  (g/mol): poids moléculaire de l'amine spécifique;  $i, j, \dots, n$  : spécifie chaque aliment consommé

### 3.3.5 Évaluation du risque

L'évaluation de risque présente s'est basée sur l'ingestion d'eau potable la vie durant. Lors de l'évaluation des risques résultant de l'exposition aux substances cancérigènes, les organismes réglementaires tels que Santé Canada et l'US EPA supposent que tout niveau d'exposition non nul est associé à un certain risque hypothétique quelconque de cancer appelé « excès de risque de cancer (ER) ».

L'évaluation du risque de cancer s'est donc réalisée en deux parties: d'abord une estimation quantitative des ER, suivie de la caractérisation de ces risques.

#### 3.3.5.1 Estimation du risque

D'après Santé Canada (1994) : « il n'existe pas de valeur unique « exacte » caractérisant adéquatement le risque de *minimis* associé à une concentration ou à une dose en deçà de laquelle les risques sont acceptables et au-dessus de laquelle ils ne le sont pas. Pour cela, le risque associé à de faibles doses est plutôt considéré comme étant un continuum : une réduction de l'exposition entraîne une réduction par incrément du risque et une augmentation de l'exposition entraîne une augmentation par incrément du risque »

Nous avons donc adopté l'approche recommandée par Santé Canada et l'US EPA à savoir que multiplier la dose d'exposition estimée par l'indice de potentiel cancérigène  $q_{humain}$  permet une estimation conservatrice de l'excès de risque de cancer associé à l'exposition considérée.



Ainsi, l'ER a été estimé comme suit :

$$ER = DEJ_{\text{nitros}} \times q_{\text{human}}$$

Avec :

ER : excès de risque de cancer (sans unité)

$DEJ_{\text{nitros}}$  (mg/kg.jour) : dose d'exposition endogène journalière à chacune des nitrosamines individuelles;

$q_{\text{human}}$  (mg/kg.jour)<sup>-1</sup> : indice de potentiel cancérigène

### 3.3.5.2 Caractérisation du risque

Afin d'identifier les paramètres ayant le plus d'impact sur la variabilité du modèle et par conséquent du risque (car linéaire à la dose), une analyse de sensibilité a été réalisée grâce au logiciel utilisé (Crystal Ball). Celle-ci nous a permis de mesurer la contribution de chaque paramètre du modèle sur la variabilité du modèle et d'identifier les facteurs d'incertitudes. Toujours, grâce au logiciel utilisé (Crystal Ball) nous avons pu calculer les coefficients de corrélation  $r^2$ . Les facteurs d'incertitude identifiés ont été discutés dans la section « discussion » de l'article scientifique.

## **4. CHAPITRE IV: ARTICLE SCIENTIFIQUE**

MODELING THE CANCER RISK ASSOCIATED WITH NITRATES IN PUBLIC  
DRINKING WATER SYSTEMS FROM FOUR RURAL REGIONS OF QUEBEC  
(CANADA)

Sandrine Chébékoué<sup>1</sup>, Patrick Levallois<sup>2,3</sup>, Denise Phaneuf<sup>3</sup>, Manuel Rodriguez<sup>4</sup>, Robert  
Tardif<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal

<sup>2</sup> Département de médecine sociale et préventive, Université Laval

<sup>3</sup> Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)

<sup>4</sup> École supérieure d'aménagement du territoire et développement régional, Université  
Laval

\* Author's correspondence:

Dr. Robert Tardif

Département de santé environnementale et santé au travail  
Université de Montréal  
C.P. 6128 Succ. Centre-ville  
Montréal Qc, Canada H3C 3J7

Tel: 514-343-6111, ext. 1515

Fax: 514-343-2200

E-mail: robert.tardif@umontreal.ca

**Running title**

Cancer risk associated with water nitrate

**Keywords**

Nitrates, nitrites, nitrosatable compounds, nitrosamines, carcinogenic risk

**Acknowledgments**

This work was supported by a joint grant from: Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) / Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) and the University of Montréal.

**List of abbreviations**

DD: daily dose

DWS: drinking water systems

ENOC: endogenous N-nitroso compounds

ER: excess cancer risk

MAC: maximum acceptable concentration

NDBA: N-nitrosodi-n-butylamine

NDEA: N-nitrosodiethylamine

NDMA: N-nitrosodimethylamine

NMEA: N-nitroso-N-methylethylamine

NOC: N-nitroso compounds

**SECTION HEADERS****Abstract****Introduction****Study area****Methods****Input parameters****Results****Discussion****Conclusion****References****Tables****Figure**

**ABSTRACT**

Overused fertilizers and manure may lead to nitrate contamination of groundwater. Ingestion of such contaminated water might increase the cancer risk for consumers. Indeed, following drinking water ingestion, nitrates are transformed into nitrites which participate in the formation of nitrosamines with some being probably carcinogenic to humans. The aim of this study was to quantitatively estimate the possible excess cancer risk (ER) for the populations of four rural regions in Canada that drink water from public drinking water systems using groundwater. These regions practice extensive breeding agriculture. The median (95<sup>th</sup> percentile) nitrate concentrations in the water of these four studied regions were: 0.18 (2.74), 0.48 (10.35), 0.32 (11) and 0.10 (4.69) mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l respectively. To estimate the ER, we considered a scenario of complete transformation of nitrite and some dietary amines precursors into their specific nitrosamines (N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodi-n-butylamine and N-nitroso-N-methylethylamine). Gastric nitrite concentrations were estimated on the basis of defined drinking water intake, stomach volume, and the transformation rate of nitrate into nitrite. Considering that levels of nitrites and each amine were kept constant for 1 hour, and taking into account the nitrosatability rate constants specific to each amine, we then estimated the daily doses of the corresponding endogenously formed nitrosamines. Furthermore, combination of each dose the human cancer potency factor  $q_{\text{human}}$  specific to each nitrosamine, allowed estimations of the ER. The highest ER estimated for N-nitrosodi-n-butylamine was in the order of  $10^{-6}$ , thus not contributing to a significant increase in the risk of cancer for those populations.

## INTRODUCTION

Currently, fertilizers and manure used for extensive agriculture are known to be the principal sources of groundwater nitrate contamination, particularly in rural regions (Fields 2004; WHO 2007). Nitrates are the most stable form of nitrogen compounds that should be considered as potential nitrate sources (WHO 2007). Even nitrites are converted into nitrates. Moreover, due to their extreme solubility in water, nitrates are easily mobilized through soil leaching. This is why they are more predominant in water than nitrites (WHO 2007). Natural levels of nitrates are typically low, less than 1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, (expressed as nitrate-nitrogen). However, when levels exceed the threshold of 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, the influence of anthropogenic activities (such as agriculture when intensively practiced) on groundwater is unmistakable (Gélinas et al. 2004; Madison and Brunett 1985). High levels of nitrates in drinking water have long been linked to methemoglobinemia in infants under three months of age (Fan and Steinberg 1996; Fan et al. 1987; Knobeloch et al. 2000). Some epidemiological studies have reported the association between cancer and nitrate intake from drinking water at levels below the current standard (De Roos et al. 2003; Ward et al. 1996; Weyer et al. 2001). Indeed, nitrites deriving from nitrates can react *in vivo* with nitrosatable compounds to form carcinogenic N-nitroso compounds (NOC) (Gangolli et al. 1994; Levallois et al. 2004; Mirvish 1995). Endogenous synthesis of NOC has been estimated to as 45–75% of the total exposure (Jakszyn et al. 2006; Tricker 1997). In adults, about 5% on average of ingested nitrates are reduced to nitrites in saliva by the oral microflora (Gangolli et al. 1994; Walker 1990). After being swallowed, nitrites quickly disappear by absorption or chemical reaction with stomach contents. In healthy people, the reaction would mostly occur at the esophageal/cardia junction where the saliva first encounters the gastric

juices. In addition, this site remains acid even after a meal, enhancing acid-catalyzed nitrosamine formation (McColl 2007; Suzuki et al. 2005). Consequently, nitrites are usually first converted by gastric acidity to nitrous acid ( $\text{HNO}_2$ ,  $\text{pK}_a$  3.37). Because of its instability,  $\text{HNO}_2$  is then converted to active nitrosating species, with nitrous anhydride ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) being the most important (Licht and Deen 1988; Mirvish 1975). These species react with nitrosatable compounds to give NOC: nitrosamides and nitrosamines. Nitrosamines are involved in some specific cancers: stomach, esophagus, nasopharynx, urinary bladder and colon (Mirvish 1995). Because a direct causal role for nitrate in cancer is not conclusive, all the current regulations concerning nitrate in drinking water are based only on methemoglobinemia. In Canada the maximum acceptable concentration (MAC) is 45 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$  (= 10 mg N- $\text{NO}_3^-/\text{L}$ ) (Health Canada 1987; INSPQ 2003), in the USA the maximum contaminant level (MCL) is 45 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$  (U.S.EPA 2006) and the World Health Organization guideline is 50 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$  (WHO 2007). Because some nitrosamines are probably carcinogenic to humans (NDEA, NDMA) there is a need to develop models that could allow the integration of cancer into the establishment of drinking water regulations.

Ingestion of nitrates from food (mainly from vegetables) is usually accompanied by antioxidants, inhibitors of endogenous nitrosation. Tap water does not contain antioxidants, so the ingestion of the nitrates contaminating drinking water may increase the risk of cancers for the exposed populations (Grosse et al. 2006). Especially in Canada where adult consumption of drinking water with nitrate concentrations less than 20 mg N/L is not forbidden, explaining the relevance of this study.

In this paper, we use a probabilistic approach to estimate the endogenous exposure from four selected nitrosamines (N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine



(NDEA), N-nitrosodi-n-butylamine (NDBA), and N-nitroso-N-methylethylamine (NMEA)) by considering exposure to nitrates levels in public drinking water systems from regions with extensive breeding agriculture activities. According to the classical risk assessment approach, we then estimated the excess cancer risk (ER) resulting from that exposure.

## **STUDY AREA**

The study area represents four rural regions of Quebec province (Canada) and covers the watersheds of the following rivers: Boyer, Chaudière, Etchemin, Richelieu, Rimouski, Saint-Charles and Yamaska. These watersheds whose fertilizer loads exceeded the soil's natural needs, cover a large part of the agricultural territory and contain the majority of the farm producers in Quebec (Gélinas et al. 2004; Phaneuf et al. 2004). Data on nitrate concentrations were from 244 drinking water systems (DWS) fed with groundwater, and were supplied by the Quebec Ministry of the Environment.

## **METHODS:**

Because the excess cancer risks estimated here were due to nitrosamines, we first estimated the exposure daily dose (DD) for the four chosen nitrosamines endogenously formed in the stomach. Nitrosamines constitute a family of components whose the human toxicity is still unclear. That is why for this study, we chose those having the most information (amine concentrations, frequency in food and  $q_{\text{human}}$ ) allowing the ER estimations. The DD depends on two main precursors: concentrations of nitrites in the stomach after transformation of nitrates ingested through contaminated drinking water and the daily intake of pertinent dietary amines. Therefore, we first estimated these

precursors. Furthermore, the combined effect of those risk variables was assessed using a simple mathematical model proposed by Shephard et al. (1987) and used recently by Phaneuf et al. (2004).

❖ **Exposure assessment: estimation of the daily exposure dose of nitrosamines**

Probabilistic models were chosen because they allow a robust examination of input parameters. For instance, we use a model (equation 4) that integrates nitrate concentrations and parametric distributions of the input parameters: drinking water intake, transformation rate of nitrate into nitrite, stomach volume and daily dose of amines under the assumption of independence of parameters. Probability distributions of those parameters were used in order to take into account their variability within the studied population. Monte Carlo simulations led to an approximation of their sampling distributions. Finally, the model that was used allowed the  $DD_{\text{nitros}}$  to be computed from outputs of Monte Carlo simulations consisting of 10,000 iterations, using Crystal Ball (CB) software (Crystal Ball<sup>®</sup>, Decisioneering Inc., Colorado).

a) Nitrate concentrations in drinking water

Outliers were not eliminated from the data sets in order to better represent local variability between nitrate levels in DWS from the same region. A khi-2 test was used to fit a distribution to nitrate concentrations in each region. Both measured and simulated data were used to estimate the levels of nitrates in the public DWS of all the studied regions. Raw data of nitrate concentrations were expressed as mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (nitrate nitrogen), so we expressed them in molar form as follows:

$$[NO_3^-](mol/L) = \frac{[NO_3^-](mg\ N - NO_3^-/L) \times 4.429}{MW_{nitrate}} \quad (1)$$

Where:

$[NO_3^-]$  (mg N- $NO_3^-/L$ ): nitrate concentrations expressed as nitrate nitrogen (raw data)

4.429: derived from the fact that 0.226 mg N- $NO_3^-/L$  is equivalent to 1 mg  $NO_3^-/L$ ;

$MW_{nitrate}$ : molecular weight of  $NO_3^-$  (= 62 g/mol = 62 000 mg/mol)

#### b) Estimation of nitrite concentrations in the stomach

The total daily amount of water was assumed to be all ingested at one meal. Indeed, we considered the stomach nitrite concentrations computed here as corresponding to the total quantity swallowed daily after the oral bacterial transformation of the nitrates contained in water ingested.

$$[NO_2^-] = \frac{[NO_3^-] \times TR \times IR_w}{V_s} \quad (2)$$

Where:

$[NO_2^-]$ : stomach nitrite concentration (mol/L);  $[NO_3^-]$ : nitrate concentration (mol/L); TR: transformation rate of nitrate into nitrite (%);  $IR_w$ : drinking water ingestion rate (L);  $V_s$ : stomach volume (L)

## c) Estimation of daily doses of amines

The daily dose of each dietary amine was computed by multiplying the ingestion rate of each food item by its amine concentration (Shephard et al. 1987) and summing across all foods.

$$DD_{am} = \frac{([am] \times IR_f)_i + ([am] \times IR_f)_j + \dots + ([am] \times IR_f)_n}{MW_{am}} \quad (3)$$

Where:

$DD_{am}$ : daily dose of a specific amine (mol/day)

$[am]_f$ : concentration of a specific amine in a specific food item (mg/kg)

$IR_f$ : specific food ingestion rate (kg/day);

$MW_{am}$ : amine's molecular weight (g/mol)

$i, j, \dots, n$ : specific food item

## d) Exposure model

$$DD_{nitros} = \frac{[NO_2^-]^2 \times TDI_{am} \times K \times 3600 \times MW_{nitros}}{BW} \quad (4)$$

Where:

$DD_{nitros}$ : daily dose of each nitrosamine (mg/kg.day);

$[NO_2^-]$ : stomach nitrite concentrations (mol/L);

<sup>2</sup>: because  $2NO_2^-$  are required to form the nitrosating species  $N_2O_3$ .

$DD_{am}$ : daily dose of a specific amine (mol/day)

$K$ : nitrosatability rate constant ( $(\text{mol/L})^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). It reflects the speed at which each amine is nitrosated.

3600 (seconds): = 1 hour, the estimated time for the levels of amines and nitrites precursors to remain constant through the esophageal/cardia region.

$BW$ : average human body weight (Kg); here we considered a default  $BW = 70$  kg.

❖ **Risk assessment model:**

$$ER = DD_{nitros} \times q_{human} \quad (5)$$

Where:

$ER$ : excess cancer risk associated with the exposure of a  $DD$  of a specific nitrosamine formed after ingestion of a nitrate dose through drinking water (no units)

$q_{human} (\text{mg/kg} \cdot \text{day})^{-1}$ : cancer potency factor describing the  $ER$  associated with exposure to 1 mg of a given nitrosamine/kilogram of  $BW$ . Because animal studies are performed with large doses of chemicals, the dose/response (here the cancer) relationship is extrapolated to low doses using models such as the linearized multistage (LMS). Using this model, the relationship is linearized at low doses so that a slope  $q_1$  can be derived, as well as its 95% upper confidence limit  $q_1^*$ . The latter is then taken as an upper bound of the potency of the chemical in inducing cancer at low doses. After scaling, a  $q_{animal}$ , and then a  $q_{human}$ , are estimated as the potency of the chemical in humans. The  $q_1^*$  used for this analysis were drained from CalEPA database (OEHHA 2006) rather than the IRIS

database from the US EPA because the former was more recent. The procedure used was globally the same, that is why US EPA stated that values listed in IRIS will not be revisited solely just to incorporate changes in cancer potency values due to calculation methods contained in the CalEPA (OEHHA 2005).

❖ **Sensitivity analysis:**

To measure the contribution of the input parameters to the ER estimates variability, a sensitivity analysis was performed using CB. This procedure allowed the identification of parameters having the greatest impact on the variability of the ER estimates. With the same software, rank correlation coefficients ( $\theta$ ) were calculated too for the ER model.  $\theta$ , a nonparametric measure of association is based on the ranks of the data values and it is sensitive to the strength of linear relationships and ranges of variation of a model relative to its inputs (Fristachi and Rice 2007).

Assumptions

- 1) (Nitrates + nitrites) levels were assumed to be nitrates levels because nitrites were found in trace levels in water
- 2) Amine concentrations in food are representative of levels encountered today
- 3) Water intake (Roseberry and Burmaster 1992), nitrate concentrations and daily intake of amine (Singh et al. 1997) follow a lognormal distribution whereas the transformation rate follows a normal distribution
- 4)  $DD_{am}$  and water were assumed to be all ingested at one meal

- 5) Gastroesophageal junction and cardia are the only regions where there is the necessary acidic pH, high nitrite level, and low ascorbic acid to allow maximal luminal nitrosation (McCull 2007)
- 6) The precursor concentrations were assumed to remain constant for 3600 seconds
- 7) We assumed that all adults weigh 70 kg and the stomach volume equal to 0,5 L
- 8) We consider the complete transformation of precursors (nitrites and amines) to the corresponding nitrosamines

## **INPUTS PARAMETERS**

- 1) Nitrate concentrations in public drinking water systems

Nitrate concentrations in the public DWS of the four studied regions were pooled from January 2002 to June 2004. At the beginning, we obtained (samples (DWS)): 265 (49), 424 (71), 400 (81) and 191 (43) for regions A, B, C and D respectively. In Quebec, nitrate in drinking water is monitored two to four times per year. Therefore, only municipalities having a minimum of three measurements for at least two years from the three-year study period were retained for analysis. Also, we retained only samples from distribution systems rather than those of raw water because they reflect the water quality at the tap. Finally, only (samples (DWS)) 262 (47), 416 (64), 393 (78) and 185 (38) left from regions A, B, C, and D respectively. We then calculated mean concentrations on a regional basis from all those samples pooled in the same region.

- 2) Daily drinking water ingestion rate

The distribution of daily drinking water intake was developed using values for adults reported in Caron et al. (2004): mean = 1.2 L and standard deviation = 0.9 L. In their

study, the authors estimated quantities of tap water daily consumed using telephone interviews. These consumptions also included the quantities of water used for the preparation of various types of drinks, both cold and warm.

### 3) Transformation rate of nitrates to nitrites

This rate of transformation was estimated from the literature. According to the documents consulted (WHO 2007; Gangolli et al. 1994; Walker 1990; Eisenbrand et al. 1980b), in adults 5% on average of the ingested nitrates would be transformed into nitrites. In healthy people, this rate increases with an increase in age (Siddiqi et al. 1992; Eisenbrand et al. 1980b; Forman 1989). In addition, there are large inter-individual variations that are opposed to much less intra-individual variations (Bos et al. 1988; Doel et al. 2005). Maximum rates reaching approximately 30% were reported (Suzuki et al. 2005). A distribution was developed using those data as mean = 5% and 95<sup>th</sup> percentile = 30%.

### 4) Stomach volume

The esophago/cardia region is where the nitrites in saliva first encounter acidic gastric juice. In addition, this region is known to escape the buffering effect of food and remains highly acidic even after meals. Besides, an active secretion of the inhibitor ascorbic acid occurs downstream in the antral region. Consequently, the esophago/cardia region is the main site allowing maximal luminal nitrosation (McColl 2007). Therefore, according to this information, we consider the stomach volume as the esophago/cardia region estimated here as equal to 0.5 L.



### 5) Daily dose of amines

This parameter depends on two main factors: concentration of each studied amine (dimethylamine, diethylamine, methylethylamine, n-butylamine) in a specific food and the daily consumption of that specific food. Amine concentrations in food were taken from the risk assessment of Shephard et al. (1987). To better represent Canadian population, we combined those data with Canadian food consumption rather than US consumption as it was the case for Phaneuf et al. (2004). Because we didn't find data on actual food consumption for the Canadian population, we used an estimation of the daily food consumption of Canadians from Statistique Canada (2004). Distributions of the DD of each amine were performed using mean and standard deviation values calculated from available data.

## RESULTS

### *Nitrate levels in the regions*

In the study's rural regions, the mean nitrate concentrations were all below the Quebec standard of 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Table 1). There was great variability in the nitrate levels between DWS of the same region. Indeed, although mean concentrations were below the threshold of 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, maximum levels greater than a mean concentration of 5 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L were observed everywhere: 8.7; 20.1; 18 and 6 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L for regions A, B, C and D, respectively. Moreover, some single cases were observed in regions B and C, where not only the P95 exceeded the standard, but some of their municipalities reached maximum levels of 20.1 and 18 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L respectively. Differences between P95 and maximums were particularly high in regions A, B and C.

### *Classification of nitrates levels in the drinking water systems*

In all the regions, most of the DWS ( $\geq 85\%$ ) presented concentrations below 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Table 2). However, several DWS (4 in regions A and D; 8 and 5 in regions B and C, respectively) had concentrations between 3.1 and 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Note that out of the 8 DWS in region B, 2 represented about 8% of the total samples. Similarly in region C, 1 of the 5 DWS represented about 15% of the samples (data not shown). Frequencies of measurements exceeding the MAC were very low. In this instance, there were two DWS in region B (8% of samples) and only one (5% of samples) in region C.

### *Daily dose for amines*

DD<sub>am</sub> were mostly below 10 mg/day (Table 3), with the exception of n-butylamine, which had the highest DD ( $\mu = 11.34$  and P95 = 65 mg/day). Variability in DD<sub>am</sub> was high according to foodstuff, especially for n-butylamine ( $11.34 \pm 26.92$  mg/day) and diethylamine ( $0.85 \pm 2.26$  mg/day).

### *Daily dose of nitrosamines*

Of all the nitrosamines studied, NDBA had the most significant endogenous formation ( $\mu = 5.4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/day}$ ), followed by NDEA ( $\mu = 2.5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/day}$ ), and then NDMA ( $\mu = 1.5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/day}$ ) and NMEA ( $\mu = 4.8 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/day}$ ) (Table 4). All the nitrosamine doses were well correlated successively with DD<sub>am</sub> ( $\theta = 0.51$ ), drinking water IR ( $\theta = 0.44$ ), and finally the transformation rate ( $\theta = 0.26$ ).

### *Risk assessment*

The ERs resulting from endogenous exposure to nitrosamines following the ingestion of water nitrate were low (Table 5). The highest ERs estimated for NDBA were associated with exposure to the nitrate levels in regions B ( $2.7 \times 10^{-6}$ ) and C ( $2.2 \times 10^{-6}$ ). Generally, NDBA presented the highest risks, followed by NDEA and NDMA, respectively. ERs were proportional to the nitrosamine doses and human cancer potency factor.

### *Sensitivity analysis*

For NDBA, NDEA and NDMA, DDam contributed 46 – 51% on the ER variability; IRw contributed 36 – 40% and TR about 13 %. For those nitrosamines, the results were well correlated with DDam ( $\theta = 0.51$ ), IRw ( $\theta = 0.44$ ) and TR ( $\theta = 0.26$ ). The results were different for NDEA for which DDam contributed 31 % ( $\theta = 0.38$ ), IRw 51 % ( $\theta = 0.49$ ) and TR 18 % ( $\theta = 0.29$ ) (Figure 1).

## **DISCUSSION**

The International Agency for Research on Cancer (IARC) recently concluded that « ingested nitrate or nitrite under conditions that result in endogenous nitrosation is probably carcinogenic to humans (group 2A) » (Grosse et al. 2006). Indeed, health effects due to nitrates in food are assumed to be counterbalanced by the antioxidants they contain. Plain drinking water does not contain antioxidants, so ingestion of nitrates contaminated water outside of meals may increase the cancer risks for exposed people. The aim of our study was to quantitatively estimate the excess cancer risk associated with the presence of nitrates in drinking water. Drinking water looks like it is well monitored in Quebec. Indeed, nitrate concentrations in the studied regions were low,

regardless of the strong agricultural activities (Table 1). Indeed, most of the measurements were below the MAC of 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, and even the threshold of 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Table 2). Computing means from available nitrate concentrations per region would hypothesize that all the DWS have the same size. More, this would likely lead to an underestimation of the real exposure from some DWS. Indeed, in all the regions, a minimum of four DWS had nitrate levels exceeding 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Table 2). This could mean that in the same region, some municipalities would be more exposed than others. Moreover, distributions of samples taken at different taps three times per year (or as required) may not adequately reflect exposure, considering the spatial variation. All this may explain the variations observed in Table 1.

The estimated excess cancer risks (ER) associated with nitrate levels in all the studied regions were non significant,  $\leq 1 \times 10^{-6}$  (Table 5). Even after combining the effects of the four studied nitrosamines, the ERs were still in the order of  $10^{-6}$ , level of risk generally considered as acceptable. The highest ERs were due to NDBA, likely because the highest exposure was related to it. Indeed, according to the model used (equation 4), the ER is a linear function of exposure dose and cancer potency factor. The ERs estimated for isolated nitrate concentrations of 3.5 and 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L revealed ER (NDBA) =  $7.8 \times 10^{-6}$ ;  $2.2 \times 10^{-5}$  and  $8.6 \times 10^{-5}$  respectively (data not shown). Therefore, for increasing concentrations below the standard, the risks tended to be considerable. These results are closer to those from some epidemiological studies in which increases in cancer incidences were observed at nitrate levels below the MAC (De Roos et al. 2003; Ward et al. 1996; Weyer et al. 2001). The strength of this study is that it allows a direct estimation of the endogenous exposure to nitrosamines in the population by taking into account the probability distribution of parameters and kinetics occurring between

precursors (Phaneuf et al. 2004; Shephard et al. 1987; Huber and Lutz 1984). Our ER estimates correlate well with the risk assessment done by Shephard and Phaneuf. Although the chemistry and kinetics of *in vivo* nitrosamine formation are understood, there are inadequate data on nitrosamine formation and metabolism to accurately estimate quantitative levels in humans, except in a few cases involving the gastrointestinal tract. (Jakszyn et al. 2006b) estimated the latter to be about 93  $\mu\text{g}$  /day. Kyrtopoulos (1989) reported concentrations of 20  $\mu\text{M}$  for endogenous NOC (ENOC) after ingestion of 200 mg of nitrate by three individuals with normal gastric acidity. Vermeer et al. (1998) estimated endogenous NDMA exposure as 174  $\mu\text{g}$ /day after ingestion of about 220 mg of nitrate. Thus a comparison of our results to the latter was difficult either because the number of participants was low (= 3 in Kirtopoulos' study) or because the nitrates doses were at least fifteen times higher than those found in the distribution systems we studied (Jakszyn et al. 2006b; Vermeer et al. 1998). Moreover, in those studies, estimates were made on the basis of feces (Jakszyn et al. 2006b) or urine (Vermeer et al. 1998). In such a case, exposure may be due to whole-body analysis, as opposed to isolation of biosynthesized ENOC only from the stomach.

Endogenous nitrosamine formation is a function of several factors (TR, IRw and DD) that control the main precursors, nitrites and amines. In this study, lack of data on the Canadian food ingestion rate, as well as limited data on amine concentrations in food and on estimates of the transformation rate may have decreased the precision and increased the uncertainty of our endogenously formed nitrosamine estimates. Therefore, in our literature review on the transformation rate (estimated here as 5 to 30%), the number of individuals was too low (Eisenbrand et al. 1980b; Bos et al. 1988; Doel et al. 2005; Spiegelhalder et al. 1976) or not specified (Tannenbaum et al. 1976). A sensitivity

analysis conducted by our team revealed that it contributed for about 97% of the variability in nitrite formation (data not shown). Moreover, according to equation 4, nitrosamine formation is proportional to the square of the nitrite concentrations. Therefore, doubling the nitrite concentrations means quadrupling the nitrosamine quantities, thus demonstrating the major impact of this factor.

Another limitation of our study was the lack of data for estimating the  $DD_{am}$  that contributes to 31 to 51 % of the model variability according to our sensitivity analysis (Figure 1). Indeed, several foods were not listed in the Canadian data bases (StatistiqueCanada 2004). Moreover, in the major cases, concentrations of nitrosatable compounds were listed only for certain foods and those data dated from 1987 (Shephard et al. 1987). For instance, amide precursors are largely consumed in the form of proteins known to be greatly concentrated in meat, poultry and fish. Unfortunately, we couldn't find data for the concentrations of these substances in food. It is also the example of N-nitroso-N-methylurea ( $q_{human} = 120 \text{ (mg/kg/day)}^{-1}$ ) for which the precursor methylurea is reputed to be abundant in seafoods (Shephard et al. 1987). For creatine and creatinine which could reach levels up to 5000 - 7000 mg in fish (Shephard et al. 1987), there were no data on their corresponding NOC. While arylamines derivatives are known to be potent carcinogens (Mirvish 1995; Shephard et al. 1987; Mirvish et al. 1972), no carcinogenic potency factors are listed for the specific derivatives of the major widespread precursors aniline and N-methylaniline.

In addition, we noted that it could be helpful to establish indicators for amine categories because most of them can generate the same nitrosamine (Mirvish 1975a) at different rates, according to their basicity (different  $K_s$ ).

Although it is preferable to integrate the inhibitory effect of vitamin C, we unfortunately could not do so. Indeed, despite the fact that many data exist on its *in vivo* inhibition rates, they are all related to the conditions of administration, particularly the time (before, at the same time or after amine) (Mirvish 1995). Therefore, because of this inhibition rate/time relationship and the conditions of administration indicating the importance of the kinetic mechanisms, integration of this parameter will fit better with a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling rather than our probabilistic approach. In addition, there is an endogenous synthesis of vitamin C (Suzuki et al. 2005; Schorah et al. 1991) estimated to be 0.4 mg/h in the stomach (Mirvish 1995) which can complicate the estimations.

## CONCLUSION

Our analysis revealed that nitrate levels in municipal drinking water systems in the studied regions did not contribute to an increase in the cancer risk of people who drink this water. However, a lack of data on food consumption, on amine concentrations in food and on the transformation of nitrate to nitrite may have introduced uncertainties in our risk estimates. We noted that the sources and levels of amines in the diet should be studied comprehensively, for example, by developing methods for identifying classes of compounds (because NOC are a large family of compounds) at least in foods that are most consumed. Also, studies investigating the real rates by which nitrates are transformed to nitrites in the entire population, and carried out under standard conditions, would be worthwhile for improving the quantitative relationship between nitrate intake and exposure to ENOC. Overall, a combination of our probabilistic approach with a model that integrates real doses of precursors and antioxidants

according to physiological parameters would allow a more realistic estimate of the total risks contributed by nitrosamines. This will finally help in taking cancer into account when establishing standards that are unfortunately only based on infant methemoglobinemia.



**REFERENCES**

Bos PMJ, Van den Brandt PA, Wedel M, Ockhuizen T. 1988. The reproducibility of the conversion of nitrate to nitrite in human saliva after a nitrate load. *Food Chem Toxicol* 26(2): 93-97.

Caron M, Levallois P, Gingras S, Phaneuf D. 2004. Étude de la consommation d'eau dans la population adulte. In: Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé. Québec: Ministère du Développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP). Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), 74 p. + annexes.

De Roos AJ, Ward MH, Lynch CF, Cantor KP. 2003. Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology* 14(6): 640-649.

Doel J, Benjamin N, Hector MP, Rogers M, Allaker RP. 2005. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *Eur J Oral Sci* 113(1): 14-19.

Eisenbrand G, Habs M, Schmähl D, Preussmann R. 1980a. Carcinogenicity of N-Nitroso-3-hydroxypyrrolidine and dose-response study with N-Nitrosopiperidine in rats. In: *N-Nitroso-Compounds: Analysis, Formation and Occurrence* IARC Scientific Publications N° 31 (Walker E, Gričič, L, Castegnaro, M, and Borzsonyi, M., ed): World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp. 657-663.

Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussmann R. 1980b. Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 37(4): 227-231.

Fan AM, Steinberg VE. 1996. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 23: 35-43.

Fan AM, Willhite CC, Book SA. 1987. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 7(2): 135-148.

Fields S. 2004. Global nitrogen: cycling out of control. *Environ Health Perspect* 112(10): A556-A563.

Forman D. 1989. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 8(2): 443-458.

Fristachi A, Rice G. 2007. Estimation of the total daily oral intake of NDMA attributable to drinking water. *Journal of Water & Health* 5(3): 341-355.

Gangolli SD, Van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJA, et al. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of pharmacology (Environmental Toxicology and Pharmacology Section)* 292: 1-38.

Gélinas P, Rousseau N, Cantin P, Cardinal P, Roy N. 2004. Caractérisation de l'eau souterraine dans les sept bassins versants. In: Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé. Québec: Ministère du Développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec(MDDEP). Institut national de santé publique du Québec (INSPQ).

Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology* 7(8): 628-629.

Health Canada. 1987. Nitrate/Nitrite. Available: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/nitrate\\_nitrite/index-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/nitrate_nitrite/index-eng.php) [accessed 10 June 2008].

Huber KW, Lutz WK. 1984. Methylation of DNA in stomach and small intestine of rats after oral administration of methylamine and nitrite. *Carcinogenesis* 5(12): 1729-1732.

INSPQ. 2003. Fiche Nitrates/Nitrites. Groupe Scientifique sur l'eau. Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) 1-12.

Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibanez R, Amiano P, Pera G, et al. 2006a. Intake and food sources of nitrite and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition* 9(6): 785-791.

Jakszyn P, Bingham S, Pera G, Agudo A, Luben R, Welch A, et al. 2006b. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* 27(7): 1497-1501.

Knobeloch L, Salna B, Hogan A, Postle J, Anderson H. 2000. Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ Health Perspect* 108(7): 675-678.

Kyrtopoulos SA. 1989. N-nitroso compound formation in human gastric juice. *Cancer Surv* 8(2): 423-438.

Levallois P, Bustinza R, Gingras S. 2004. Drinking water intrates and cancer: review of epidemiologic studies. *Epidemiology* 15(4): S110-S111.

Licht WR, Deen WM. 1988. Theoretical model for predicting rates of nitrosamine and nitrosamide formation in the human stomach. *Carcinogenesis* 9(12): 2227-2237.

Madison RJ, Brunett JO. 1985. Overview of the occurrence of nitrate in ground water of the United States. In: *National water summary 1984-Hydrologic events, selected water-quality trends, and ground-water resources* (U.S. Geological Survey, ed), 93-105.

McColl KEL. 2007. Hostile environment of the gastroesophageal junction J Clin Gastroenterol 41(Supplement 2): S102-S107.

Mirvish SS. 1995. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Cancer Lett 93: 17-48.

Mirvish SS. 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. Toxicol Appl Pharmacol 31: 325-351.

Mirvish SS, Greenblatt M, Choudari Kommineni VR. 1972. Nitrosamide formation in vivo: induction of lung adenomas in Swiss mice by concurrent feeding of nitrite and methylurea or ethylurea. J Natl Cancer Inst 48: 1311-1315.

OEHHA. 2005. Air toxics hot spots program risk assessment guidelines. Part II: Technical support document for describing available cancer potency factors. Office of Environmental Health Hazard Assessment. California Environmental Protection Agency. Available: [http://www.oehha.ca.gov/air/hot\\_spots/pdf/May2005Hotspots.pdf](http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/pdf/May2005Hotspots.pdf) [accessed 10 October 2007].

Phaneuf D, Chaussé K, Pantako O, Levallois P. 2004. Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé In: Évaluation du risque à la santé pour la population exposée aux nitrates présents dans l'eau potable. Québec: Ministère du Développement durable, de l'environnement et

des parcs du Québec (MDDEP). Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), 49p. + annexes.

Roseberry AM, Burmaster DE. 1992. Lognormal distributions for water intake by children and adults. *Risk Anal* 12(1): 99-104.

Schorah CJ, Sobala GM, Sanderson M. 1991. Gastric juice ascorbic acid: effects of disease and implications for gastric carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 53: 287S-293.

Shephard SE, Schlatter C, Lutz WK. 1987. Assessment of the risk of formation of carcinogenic N-nitroso compounds from dietary precursors in the stomach. *Food Chem Toxicol* 25(1): 91-108.

Siddiqi M, Kumar R, Kaul D, Spiegelhalder B, Preussmann R. 1992. Salivary nitrate and nitrite concentrations from a sample population of children and adults in high risk area for esophageal and gastric cancers in Kashmir, India. *Cancer Lett* 64: 133-136.

Singh AK, Singh A, Engelhardt M. 1997. The lognormal distribution in environmental applications. EPA 600R-94006. Washington, DC: US EPA, Office of Research and Development, Office of Solid Waste and Emergency Response.

Spiegelhalder B, Eisenbrand G, Preussmann R. 1976. Influence of dietary nitrite on nitrite content of human saliva: possible relevance to *in vivo* formation of N-nitroso compounds. Food Cosmet Toxicol 14: 545-548.

StatistiqueCanada. 2004. Statistiques sur les aliments au Canada. Available: <http://ivt.crepug.qc.ca/aliments/aliments2004.html> [accessed 10 October 2007].

Suzuki H, Iijima K, Scobie G, Fyfe V, McColl KEL. 2005. Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. Gut 54(11): 1527-1535.

Tannenbaum SR, Weisman M, Fett D. 1976. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. Food Cosmet Toxicol 14: 549-552.

Tricker AR. 1997. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. Eur J Cancer Prev 6: 226-268.

U.S.EPA. 2006. Consumer Factsheet on: Nitrates/Nitrites. National Primary Drinking Water Regulations. U.S. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-ioc/nitrates.html> [accessed 1 January 2008].

Vermeer ITM, Pachen DMFA, Dallinga JW, Kleinjans JCS, van Maanen JMS. 1998. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. Environ Health Perspect 106: 459-463.

Walker R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 7(6): 717-768.

Ward MH, Mark SD, Cantor KP, Weisenburger DD, Correa-Villasenor A, Zahm SH. 1996. Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology* 7: 465-471.

Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, Hallberg GR, Katamneni J, Breuer G, et al. 2001. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa women's health study. *Epidemiology* 11: 327-338.

WHO. 2007. Nitrate and nitrite in drinking-water. Background document for *development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Available: [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf) [accessed 15 November 2007].



**Table 1** Nitrate concentrations in drinking water systems of the four Quebec regions supplied with groundwater.

Regions	Nitrate concentrations (mg-N/L)					
	Mean	SD	Min	Max	P50	P95
A	0.61*	1.11	0.02	8.70	0.18	2.74
B	2.12**	3.35	0.02	20.1	0.48	10.35
C	2.07**	3.58	0.01	18	0.32	11.00
D	0.56*	1.28	0.01	6	0.10	4.69

\*: no statistical difference between region A and D ( $p < 0.001$ )

\*\* : no statistical difference between region B and C ( $p < 0.001$ )

SD: standard deviation; Min: minimum; Max: maximum; P50: 50<sup>th</sup> percentile; P95: 95<sup>th</sup> percentile

**Table 2** Classification of nitrate levels in the drinking water systems.

Regions	N <sub>DSW</sub>	N samples	N <sub>DWS</sub>		
			≤ 3 mg-N/L	3.1 to 10 mg-N/L	≥ 10 mg-N/L
A	47	262	43 (92%)	4	0
B	64	416	54 (85%)	8	2
C	78	393	72 (92%)	5	1
D	38	184	34 (90%)	4	0

N<sub>DWS</sub>: number of drinking water systems

In brackets, are the proportions (expressed as percentage) of drinking water systems to the total from the same region having nitrates levels ≤ 3 mg-N/L.

**Table 3** Total daily intakes of amines (mg/day)

Amines	Total daily intake		
	Mean	SD	P95
Dimethylamine (0.002*)	2.03	6	7.2
Diethylamine (0.01†)	0.85	2.26	4.3
n-butylamine (0.01‡)	11.34	26.92	65
Methylethylamine (0.01‡)	0.15	0.20	0.43

SD: standard deviation; P95: 95<sup>th</sup> percentile. In brackets are the specific nitrosatability rate constant K ( $M^{-2} s^{-1}$ ) of each amine.

According to database from Shephard (1987), n-butylamine was more concentrated in meat (8-1200 mg/kg). Dimethylamine is widespread in food with sea foods being the most concentrated (6-370 mg/kg). Diethylamine is not that much concentrated in food, except in rapeseed cake in which it reaches levels up to 120 mg/kg. Methylethylamine is not widespread and when found, its concentrations are not high (7.6 mg/kg).

\* Rate constant K at optimal pH for amines, from Shephard (1987)

† Rate constant from Phaneuf (2004)

‡ Arbitrary rate constant assigned

**Table 4** Daily doses of nitrosamines ( $\mu\text{g}/\text{day}$ ) calculated from a randomly generated sample of 10 000.

Nitrosamines	Daily dose of nitrosamines endogenously formed ( $\mu\text{g}/\text{day}$ )			
	Mean	SD	P50	P95
NDMA (16*)	$1.5 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^{-3}$	$7.4 \times 10^{-6}$	$4.5 \times 10^{-4}$
NDEA (36*)	$2.5 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-5}$	$7.7 \times 10^{-4}$
NDBA (11*)	$5.4 \times 10^{-3}$	$5.9 \times 10^{-2}$	$3.5 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-2}$
NMEA (22*)	$4.8 \times 10^{-5}$	$3.7 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-4}$

SD: standard deviation; P50: 50<sup>th</sup> percentile; P95: 95<sup>th</sup> percentile

NDMA: N-nitrosodimethylamine; NDEA: N-nitrosodiethylamine; NDBA: N-nitrosodi-n-butylamine; NMEA: N-nitroso-N-methylethylamine.

\*:  $q_{\text{human}} ((\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{day})^{-1})$ : human cancer potency factor specific to each nitrosamine, from California Environmental Protection agency (CalEPA) and Integrated Risk Information System (IRIS/U.S.EPA) databases.

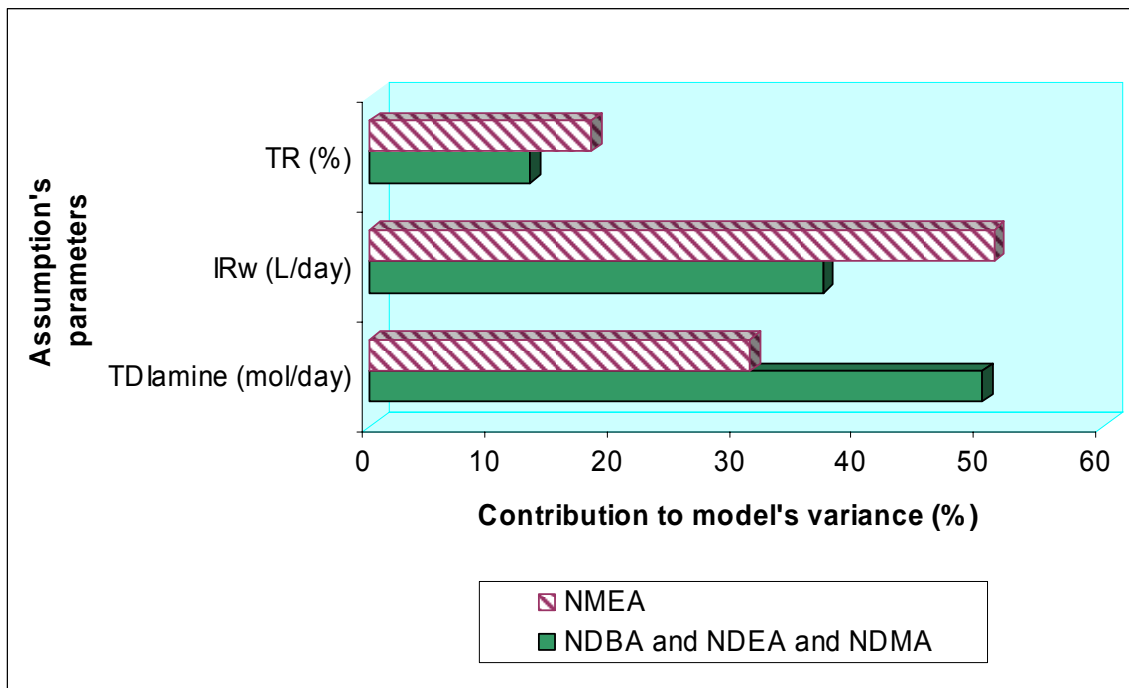
Table 5 Estimation of excesses cancer risk resulting from the endogenous exposure to **specific nitrosamine**.

Regions	Nitrosamines											
	NDBA			NDMA			NDEA			NMEA		
	Mean	P50	P95	Mean	P50	P95	Mean	P50	P95	Mean	P50	P95
A	$5.9 \times 10^{-8}$	$3.8 \times 10^{-9}$	$1.9 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-9}$	$1.2 \times 10^{-10}$	$7.2 \times 10^{-9}$	$9.0 \times 10^{-9}$	$5.0 \times 10^{-10}$	$2.8 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-9}$	$1.1 \times 10^{-10}$	$3.8 \times 10^{-9}$
B	$8.4 \times 10^{-7}$	$5.4 \times 10^{-8}$	$2.7 \times 10^{-6}$	$3.3 \times 10^{-8}$	$1.8 \times 10^{-9}$	$1.0 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-7}$	$7.1 \times 10^{-9}$	$4.0 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^{-8}$	$1.6 \times 10^{-9}$	$5.4 \times 10^{-8}$
C	$7.0 \times 10^{-7}$	$4.5 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-6}$	$2.8 \times 10^{-8}$	$1.5 \times 10^{-9}$	$8.6 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-7}$	$6.0 \times 10^{-9}$	$3.3 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-8}$	$1.3 \times 10^{-9}$	$4.5 \times 10^{-8}$
D	$5.1 \times 10^{-8}$	$3.3 \times 10^{-9}$	$1.7 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-9}$	$1.1 \times 10^{-10}$	$6.3 \times 10^{-9}$	$7.8 \times 10^{-9}$	$4.4 \times 10^{-10}$	$2.4 \times 10^{-8}$	$9.3 \times 10^{-10}$	$9.5 \times 10^{-11}$	$3.3 \times 10^{-9}$

P50: 50<sup>th</sup> percentile; P95: 95<sup>th</sup> percentile

**Figure 1 Legend**

Sensitivity analysis performed for risk characterisation. The impact of each input parameter on the variability of the model results is expressed in percentage (%). NMEA impact (hatching) is shown separately from that of NDBA, NDMA, and NDEA (solid). TR: transformation rate of nitrate to nitrite; IRw: water ingestion rate; TDIamine: total daily intake of a specific amine;  $[\text{NO}_3^-]$ : nitrate concentrations; NMEA: N-nitroso-N-methylethylamine; NDBA: N-nitrosodi-n-butylamine; NDEA: N-nitrosodiethylamine; NDMA: N-nitrosodimethylamine

**Figure 1** Sensitivity analysis

## **5. CHAPITRE V: DISCUSSION ET CONCLUSION**



## 5.1 Discussion

L'impact sur le cancer de la présence des nitrates dans l'eau potable est très difficile à évaluer. C'est d'ailleurs pourquoi le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a tenu à spécifier que ces substances sont probablement cancérogènes pour l'humain (groupe 2A) seulement « dans les conditions de nitrosation endogène » (Grosse et al. 2006). Notre analyse de risque avait pour but d'estimer des excès de risque de cancer associés à la présence de nitrates dans l'eau potable en région agricole.

Les niveaux de nitrates dans la zone étudiée étaient de façon générale tous inférieurs à la concentration maximale acceptable (CMA = 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) de nitrates dans l'eau, et aussi à 3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, seuil à partir duquel l'influence d'activités anthropiques (donc agricoles dans notre contexte) sur l'eau souterraine est indéniable (Gélinas et al. 2004; Madison and Brunett 1985). Malgré tout, il est apparu à quelques points de réseaux des régions B et C des cas isolés de dépassement de la norme. Ceci est illustré par les valeurs comprises entre les 95<sup>e</sup> centiles et les maxima calculés pour ces régions. En effet, il peut arriver que les concentrations de nitrates dans l'eau soient différentes à divers points d'un même réseau. C'est le cas lorsque plusieurs puits, qui n'ont pas la même teneur en nitrates alimentent un même réseau de distribution (INSPQ 2003). Ceci laisse supposer que dans les régions concernées, il existerait certains points qui soient plus influencés par les activités agricoles que le reste de la région. Par ailleurs, on pourrait expliquer ces faibles niveaux de nitrates dans les réseaux par le fait que les réseaux publics soient très réglementés. Et la question serait de savoir si la situation est la même pour les puits privés qui, on le sait ne sont pas réglementés.

D'après notre analyse, les concentrations de nitrates mesurées dans les divers réseaux de ces régions ne sauraient augmenter les risques de cancer de leurs populations. En d'autres termes, les excès de risque de cancer seraient négligeables ( $10^{-5} < ER < 10^{-6}$ ) pour des concentrations de nitrates inférieures à la CMA. Ce qui rejoint les conclusions de certaines études épidémiologiques sur le sujet (De Roos et al. 2003; Weyer et al. 2001; Gulis et al. 2002). Notons cependant que nos estimations présentent certaines limites essentiellement liées aux paramètres intégrés au modèle utilisé : taux de

transformation et apport quotidien total en amines alimentaires ( $AQT_{\text{amine}}$ ). Plus précisément, la caractérisation des risques que nous avons estimés nous a permis d'identifier plusieurs limites associées aux facteurs d'incertitude inhérents aux paramètres sus-cités. Ces limites sont discutées de façon plus détaillée dans l'article scientifique inclus dans ce document. Dans cette partie, nous nous attarderons à d'autres aspects qui limitent l'estimation de l'exposition aux nitrosamines, et par conséquent celle des risques qui leur sont associés.

Pour commencer, nous avons estimé des excès de risque de cancer hypothétiques associés à chaque nitrosamine individuelle. Pourtant, la plupart de leurs précurseurs aminés sinon tous se retrouvent dans les aliments couramment consommés à des taux variables. Ceci voudrait dire qu'après un repas typique, plusieurs nitrosamines seraient susceptibles d'être formées dans l'estomac à des concentrations variables et ce en fonction de la dynamique de la cinétique ayant lieu entre tous les précurseurs en présence. Compte tenu de ce fait, il serait donc plus approprié d'estimer des ER correspondant à la toxicité équivalente de ces substances, ne serait-ce que pour les plus stables que sont les dialkylnitrosamines (NDMA, NDEA, NMEA). Ceci exige donc une bonne connaissance de la dynamique cinétique qui a lieu lorsque plusieurs amines sont présentes au même moment et des mécanismes de toxicité relatifs aux mélanges de nitrosamines. Soulignons que dans cette analyse nous n'avons retenu que les nitrosamines pour lesquelles un minimum d'information existait pour estimer leurs doses endogènes ( $AQT_{\text{amine}}$ ,  $K$ ) et les ER associés ( $q_{\text{humain}}$ ). Nous n'avons donc pas pu adopter une approche de toxicité équivalente car les données de nitrosamines retenues proviennent d'études animales dans lesquelles elles ont été étudiées individuellement. Des expérimentations animales impliquant des mélanges de plusieurs nitrosamines sont donc vivement requises. Des échantillons de produits de tabac (fumée, poudre à aspirer par le nez) constitueraient justement de bons échantillons. Ceci permettrait une estimation d'excès de risque de cancer résultant de la contribution spécifique de chaque nitrosamine.

Par ailleurs, la nitrosation peut être inhibée. L'intégration de cette inhibition à l'analyse de risque permettrait une meilleure estimation des doses réelles de nitrosamines responsables du cancer. Gangolli (1981) a évoqué l'effet inhibiteur des amines biogènes qui sont des composés le plus souvent retrouvés en quantité substantielle dans les aliments que nous consommons, en plus d'être synthétisées de façon endogène. Mais l'inhibiteur le plus connu et le plus étudié reste la vitamine C. Cette dernière, en plus d'être présente dans l'alimentation dont les fruits et légumes, serait aussi sécrétée dans l'estomac (Mirvish 1995; Suzuki et al. 2005; Schorah et al. 1991).

Nous n'avons malheureusement pu l'intégrer à notre analyse de risque car cette inhibition apparaît parfois complexe. Par exemple, d'après Vermeer et al. (1999) l'ingestion de 4 tasses de thé vert inhiberait la formation de nitrosamines, alors qu'elle serait activée suite à l'ingestion de 8 tasses. L'inhibition de la nitrosation a été beaucoup plus étudiée avec la N-nitrosoproline (NPRO) qui n'est pas cancérigène. Combet et al. (2007) ont malgré tout reporté une réduction de 5 fois (20%) la dose témoin de NDMA et une inhibition totale de la formation de NDEA et de NPYR en absence de lipides *in vitro*. Ainsi, les pourcentages d'inhibition retrouvés dans la littérature varient beaucoup en fonction des études et dépendent énormément des conditions d'administration (aucune efficacité sur les nitrosamines préformées): avant, au même moment ou après l'administration des amines. En fait, ces dernières compétitionnent avec la vitamine C pour se lier aux agents nitrosant. En outre, ces taux d'inhibition sont fonction de la durée de la réaction. Ainsi, Mirvish (1995) a reporté des inhibitions moyennes de 87% et 25% de la N-nitrosoproline lorsque l'acide ascorbique (ASC) était donnée 1 et 2h respectivement après un repas enrichi en proline (PRO). Or cette dernière est nitrosée 20 fois plus rapidement que la diméthylamine (DMA) par exemple. La question est de savoir si les taux d'inhibition seraient similaires entre l'acide aminé (PRO) et la dialkylamine (DMA). Ce qui semble ne pas être sûr. De plus, même si l'auteur ne mentionne pas comment les taux de NPRO ont été mesurés, prenons pour acquis que cela a été fait comme d'habitude dans l'urine car la NPRO est la seule nitrosamine connue qui n'est pas métabolisée (NPRO test). Pourtant pour être

légitimement applicable, ces taux devraient être mesurés directement dans l'estomac ou avant que les nitrosamines ne soient absorbées et biotransformées.

D'autre part, cette inhibition est fonction de la diète. En effet, en présence des lipides, la vitamine C serait transformée en promoteur de la nitrosation endogène (Combet et al. 2007; Mirvish 1986). D'autres études d'inhibition, prenant en compte ce fait, seraient donc utiles car les lipides représentent en général une grande proportion de notre apport calorique. Cette situation est encore plus indiquée en Amérique du Nord où les jus de fruits et les boissons gazeuses sont préférés au vin au cours des repas.

## **5.2 Conclusion**

D'après les résultats de notre analyse de risque, aucune conclusion finale ne saurait être émise quant à la relation entre l'exposition aux nitrates dans l'eau potable et un risque possible de cancer pour l'humain. Celle-ci dépend fortement de la nitrosation endogène qui malheureusement est très difficile à évaluer. En effet, trop de facteurs difficiles à contrôler y sont impliqués. Pourtant les résultats obtenus jusqu'alors, autant du côté des études épidémiologiques que des expérimentations animales, laissent penser que celle-ci devrait être prise en compte dans l'établissement des normes des nitrates / nitrites dans l'eau potable qui ne sont malheureusement basées que sur le risque de méthémoglobinémie. Les normes actuelles ne seraient peut-être pas adéquates pour prévenir tous les risques potentiels à la santé dus à l'exposition aux nitrates. D'autres études cinétiques seraient utiles pour mieux définir la relation quantitative entre l'ingestion de nitrates et l'exposition endogène aux NOC, de même que pour valider des biomarqueurs de pareilles expositions dans le but de les utiliser dans de futures études épidémiologiques qui prennent en compte les sous-populations sensibles.

## **6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ACIA. 2006. Aliments - Produits de viande et de volaille - Manuel des Méthodes - Chap. 5 - Échantillonnage et analyses. Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. Disponible à: <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/meavia/mmopmmhv/chap5/5-4f.shtml#5.6> [consulté le 13 Juillet 2008].

Andrzejewski P, Kasprzyk-Hordern B, Nawrocki J, Andrzejewski P, Kasprzyk-Hordern B, Nawrocki J. 2008. N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation during ozonation of dimethylamine-containing waters. *Water Res* 42(4-5): 863-870.

ATSDR. 2007. Nitrate/Nitrite Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 37 p. Disponible à: [http://www.atsdr.cdc.gov/csem/nitrate/docs/nitrate\\_nitrite.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/csem/nitrate/docs/nitrate_nitrite.pdf) [consulté le 26 Juin 2008].

Avery AA. 1999. Infantile methemoglobinemia: reexamining the role of drinking water nitrates. *Environ Health Perspect* 107: 583-586.

Bartholomew B, Hill MJ. 1984. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem Toxicol* 22(10): 789-795.

Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. 1989. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv* 8(2): 336-356.

Bertram JS et Craig AW. 1970. Induction of bladder tumors in mice with dibutyl nitrosamine. *British Journal of Cancer* 24: 352-359.

Bos PMJ, Van den Brandt PA, Wedel M, Ockhuizen T. 1988. The reproducibility of the conversion of nitrate to nitrite in human saliva after a nitrate load. *Food Chem Toxicol* 26(2): 93-97.

Bosch HM, Rosenfield AB, Huston R, Shipman HR et Woodward FL. 1950. Methemoglobinemia and Minnesota well supplies. *J Am Water Works Assoc.* 42: 161-170.

Brender JD, Olive JM, Felkner M, Suarez L, Marckwardt W, Hendricks KA. 2004. Dietary Nitrites and Nitrates, Nitrosatable Drugs, and Neural Tube Defects. *Epidemiology* 15(3): 330-336.

Brown JL. 1999. N-nitrosamines. *Occup Med* 14(4): 839-848.  
Mirvish SS. 1971. Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidines: possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 46: 1183-1193.

CEAEQ. 2007. Détermination des nitrates et des nitrites dans l'eau; méthode colorimétrique automatisée avec le sulfate d'hydrazine et le N.E.D., MA. 303 - NO<sub>3</sub> 1.0, Rév. 3. Centre expertise analyse environnementale Québec. Ministère Développement Durable Environnement Parcs Québec (MDDEP). Gouvernement du Québec, 12p.

Chung SY, Kim JS, Kim M, Hong MK, Lee JO, Kim CM, et al. 2003. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Addit Contam* 20(7): 621-628.

COGEBY. (2001). Profil du bassin versant de la rivière Yamaska. Conseil de Gestion du Bassin versant de la Yamaska. Disponible à:  
<http://www.cogebv.qc.ca/document.htm>. [Consulté le 19 Juin 2008].

Combet E, Paterson S, Lijima K, Winter J, Mullen W, Crozier A, et al. 2007. Fat transforms ascorbic acid from inhibiting to promoting acid-catalysed N-nitrosation. *Gut*: 1-7.

Coss A, Cantor KP, Reif JS, Lynch CF, Ward MH. 2004. Pancreatic Cancer and Drinking Water and Dietary Sources of Nitrate and Nitrite. *Am J Epidemiol* 159(7): 693-701.

De Roos AJ, Ward MH, Lynch CF, Cantor KP. 2003. Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiology* 14(6): 640-649.

Dietrich M, Block G, Pogoda JM, Buffler P, Hecht S, Preston-Martin S, et al. 2005. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes Control* 16(6): 619-635.

Doel JJ, Benjamin N, Hector MP, Rogers M, Allaker RP. 2005. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *Eur J Oral Sci* 113(1): 14-19.

Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green P, Brogan S, Liefert R, et al. 1995. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med* 1: 546-551.

Druckrey H, Preussmann R et al. 1967. Organotropic carcinogenic effects of 65 different N-nitroso-compounds on BD-rats (Ger.). *Z Krebsforsch* 69: 103-201.

Egert G, Greim H. 1976. Formation of dimethylnitrosamine from pesticides carrying methylated tertiary aminogroups in the presence of nitrite at pH 3. *Food Cosmet Toxicol* 14(3): 193-195.

Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussmann R. 1980. Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 37(4): 227-231.

Ernst H, Ohshima H, Bartsch H, Mohr U, Reichart P. 1987. Tumorigenicity study in Syrian hamsters fed areca nut together with nitrite *Carcinogenesis* 8(12): 1843-1845.



Fan AM, Steinberg VE. 1996. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 23: 35-43.

Fan AM, Willhite CC, Book SA. 1987. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 7(2): 135-148.

Fields S. 2004. Global nitrogen: cycling out of control. *Environ Health Perspect* 112(10): A556-A563.

Forman D. 1989. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 8(2): 443-458.

Foster AB, Jarman M, Manson D. 1981. Synthesis and reactivity in vivo of nitrosamines and nitrosamides. In: *Safety evaluation of nitrosatable drugs and chemicals* (Ioannides C, Gibson GG, eds). London: Taylor & Francis, p. 69.

Gangolli SD, Van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJA, et al. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of pharmacology (Environmental Toxicology and Pharmacology Section)* 292: 1-38.

Gangolli SD. 1981. Metabolic activation and detoxication of nitroso compounds. In: *Safety evaluation of nitrosatable drugs and chemicals* (Ioannides C, Gibson GG, eds). London: Taylor & Francis, 157-171.

Ghazal C, Dumoulin S et al. 2006. Portrait de l'environnement du bassin versant de la rivière Nicolet. Québec, Corporation de gestion des rivières des Bois-Francs. 173 p. et 9 annexes.

Gélinas P, Rousseau N, Cantin P, Cardinal P, Roy N. 2004. Caractérisation de l'eau souterraine dans les sept bassins versants. In: Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé. Québec: Ministère du Développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec(MDDEP). Institut national de santé publique du Québec (INSPQ).

Giroux I. 2007. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Bayonne: faits saillants 2001-2005. D. d. s. d. l. é. d. l'environnement. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs: 16p.

GouvernementduQuébec. 2001. Règlement sur la qualité de l'eau potable L.R.Q., c. Q-2, r.18.1.1. Québec: Éditeur officiel du Québec.

Granli T, Dahl R, Brodin P, Bockman OC. 1989. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva: variations with salivary flow-rate. Food Chem Toxicol 27(10): 675-680.

Gravel C. 2006. Impact des pressions agricoles sur la qualité de l'eau des réseaux d'aqueducs municipaux du Québec alimentés en eau souterraine. Québec: Université Laval.

Greenblatt M, Mirvish SS, So BT. 1971. Nitrosamine studies: induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrite and secondary amines in Swiss mice. J Natl Cancer Inst 46(5): 1029-1034.

Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. The Lancet Oncology 7(8): 628-629.

Gulis G, Czompolyova M, Cerhan JR. 2002. An ecological study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Trnava District, Slovakia. *Environ Res* 88: 182-187.

Herron DC, Shank RC. 1980. Methylated purines in human liver DNA after probable dimethylnitrosamine poisoning. *Cancer Res* 40(9): 3116-3117.

IARC. 1998. Some N-nitroso Compounds. World Health Organisation. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

Iijima K, Henry E, Moriya A, Wirz A, Kelman W, McColl KEL. 2002. Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 122: 1248-1257.

INSPQ. 2003. Fiche Nitrates/Nitrites. Groupe Scientifique sur l'eau. Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) 1-12.

IPCS. 1999. Nitrates and nitrites. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph (Group Monograph) G016 Chemical. Disponible à: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg016.htm> [Consulté le 30 Janvier 2008].

Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibanez R, Amiano P, Pera G, et al. 2006. Intake and food sources of nitrite and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition* 9(6): 785-791.

Jakszyn P et Gonzalez CA. 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World journal of Gastroenterology* 12(27): 4296-4303.

Kleinjans JCS, Albering HJ, Marx A, van Maanen JMS, van Agen B, ten Hoor F, et al. 1991. Nitrate contamination of drinking water: evaluation of genotoxic risk in human populations. *Environ Health Perspect* 94: 198-194.

Kyrtopoulos SA. 1989. N-nitroso compound formation in human gastric juice. *Cancer Surv* 8(2): 423-438.

Levallois P, Ayotte P, Louchini R, Desrosiers T, Baribeau H, Phaneuf D, et al. 2000. Sources of nitrate exposure in residents of rural areas in Quebec, Canada. *J Exposure Anal Environ Epidemiol* 10: 188-195.

L'hirondel J, L'hirondel J-L. 2002. Nitrate and man: toxic, harmless, or beneficial? Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing.

Lijinsky W. 1984. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. *Food Chem Toxicol* 22(9): 715-720.

Lijinsky W, Kovatch R, Riggs CW. 1983. Altered incidences of hepatic and hemopoietic neoplasms in F344 rats fed sodium nitrite. *Carcinogenesis* 4(9): 1189-1191.

Lijinsky W, Reuber MD. 1980. Tumours induced in Fischer 344 rats by the feeding of disulfiram together with sodium nitrite. *Food Cosmet Toxicol* 18: 85-87.

Luca D, Luca V, Cotor F, Raileanu L. 1987. In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutat Res* 189(3): 333-339.

Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nature reviews Microbiology* 2: 593-602.

Madison RJ, Brunett JO. 1985. Overview of the occurrence of nitrate in ground water of the United States. In: National water summary 1984-Hydrologic events,

selected water-quality trends, and ground-water resources (U.S.GeologicalSurvey, ed), 93-105.

McColl KEL. 2007. Hostile environment of the gastroesophageal junction J Clin Gastroenterol 41(Supplement 2): S102-S107.

McGuire MJ, Lieu NI, Pearthree MS. 1999. Using chlorite ion to control nitrification. J Am Water Works Assoc 91: 52-61.

MDDEP. 2002. La gestion intégrée de l'eau par bassin versant. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parc du Québec. Disponible à: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/index.htm>. [Consulté le 16 Juin 2008]

MDDEP. 2007. Guide technique. Captage d'eau souterraine pour des résidences isolées. Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parc du Québec. Disponible à: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/souterraines/guide.pdf> [Consulté le 4 Février 2008].

Mirvish SS. 1971. Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidines: possible implications for the etiology of human gastric cancer. Journal of the National Cancer Institute 46: 1183-1193.

Mirvish SS. 1975. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. Toxicol Appl Pharmacol 31: 325-351.

Mirvish SS, Cardesa A, Wallcave L, Shubik P. 1975. Induction of mouse Lung adenomas by amines or ureas plus nitrite and by N-nitroso compounds: effect of ascorbate, gallic acid, thiocyanate, and caffeine. J Natl Cancer Inst 55(3): 633-636.

Mirvish SS, Bulay O, Runge RG, Patil K. 1980. Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylamine, N-nitroso-L-proline and sodium nitrite administered in drinking water to rats. *Journal of National Cancer Institute* 64: 1435-1442.

Mirvish SS. 1986. Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. *Cancer* 58(8 Suppl): 1842-1850.

Mirvish SS. 1994. Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers. *Cancer Res* 54(Suppl): 1948S-1951S.

Mirvish SS. 1995. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 93: 17-48.

Mirvish SS, Reimers KJ, Kutler B, Chen SC, Haorah J, Morris CR, et al. 2000. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time. *Eur J Cancer Prev* 9(5): 335-342.

Montesano R, Bartsch H. 1976. Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards. *Mutat Res* 32: 179-228.

Morales Suarez-Varela MM, Llopis Gonzalez A, Tejerizo Perez ML, Ferrandiz Ferragud J. 1993. Concentration of nitrates in drinking water and its relationship with bladder cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 12(4): 229-236.

Morales-Suarez-Valera MM, Llopis-Gonzalez A, Tejerizo-Perez ML. 1995. Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol* 11(1): 15-21.

Mueller DK, Helsel DR. 1996. Nutrients in the Nation's waters -Too much of a good thing? U.S. Geological Survey Circular 1136, 24 p.

NIPHEP. 1989. Integrated criteria document nitrate. National Institute for Public Health and Environmental Protection (RIVM). The Netherlands. Vol. 758473012. 196p. [Abstract] Disponible par la base de données TOXNET à: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~YW3N89:1> [Consulté le 29 Décembre 2008]

Nolan BT, Hitt KJ, Ruddy BC. 2002. Probability of nitrate contamination of recently recharged groundwaters in the conterminous United States. *Environ Sci Technol* 36: 2138-2145.

Nyakas C, Buwalda B, Markel É, Korte MS, Luiten P, G.M. 1994. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist nimodipine. *Eur J Neurosci* 6(5): 746-753.

OEHHA. 1997. Public Health Goals for nitrate and nitrite in drinking water. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA), California Environmental Protection Agency (CalEPA). CA, 14p.

OEHHA. 2005. Air toxics hot spots program risk assessment guidelines. Part II: Technical support document for describing available cancer potency factors. Office of Environmental Health Hazard Assessment. California Environmental Protection Agency. Disponible à: [http://www.oehha.ca.gov/air/hot\\_spots/pdf/May2005Hotspots.pdf](http://www.oehha.ca.gov/air/hot_spots/pdf/May2005Hotspots.pdf) [Consulté le 10 Octobre 2007].

OEHHA. 2006. Public Health Goal for N-nitrosodimethylamine in drinking water. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA), California Environmental Protection Agency (CalEPA)  
CA, 60p.

Ohshima H, Bartsch H. 1981. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res* 41: 3658-3662.

OMS. 2004. Nitrates and Nitrites in drinking-water. WHO/SDE/WSH/04.08/56. Rolling revision of the WHO guidelines for drinking-water quality. Draft for review and comments. Geneva: world Health Organisation. Disponible à: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/en/nitratesfull.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/en/nitratesfull.pdf) [Consulté le 10 Juin 2008].

OMS. 2007. Nitrate and nitrite in drinking-water. Background document for *development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Disponible à: [www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf) [Consulté le 15 Novembre 2007].

Painchaud J. 2007. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Saint-François: faits saillants 2001-2003. D. d. s. d. l. é. d. l'environnement. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs: 19p.

Pelletier L. 2005. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Etchemin: faits saillants 2001-2003. D. d. s. d. l. é. d. l'environnement. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs: 10p.

Pelletier D. 2008. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Kamouraska: faits saillants 2004-2006. D. d. s. d. l. é. d. l'environnement. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs: 12p.

Peto R, Gray R et al. 1982. Effects on two tonnes of inbred rats of chronic ingestion of diethyl- or dimethylnitrosoamine: an unusually detailed dose-response study. *Imperial Cancer Res Fund, Cancer Studies Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, Radcliffe Infirmary, Oxford*.



Peto R et Gray R. 1984. Nitrosamine carcinogenesis in 5120 rodents: chronic administration of sixteen different concentrations of NDEA, NDMA, NPYR and NPIP in the water of 4440 inbred rats, with parallel studies on NDEA alone of the effect of age of starting (3,6 or 20 weeks) and of species (rats, mice or hamsters). N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer, IARC Scientific Publications, N° 57. I. K. O'Neill, R. C. Von Borstel, C. T. Miller, J. Long and H. Bartsch, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp.501-512.

Phaneuf D, Chaussé K, Pantako O, Levallois P. 2004. Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé In: Évaluation du risque à la santé pour la population exposée aux nitrates présents dans l'eau potable. Québec: Ministère du Développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (MDDEP). Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), 49p. + annexes.

Preussmann R, Schmähl D et al. 1977. Carcinogenicity of N-nitrosopyrrolidine: dose-response study in rats. Z Krebsforsch 90: 161-166.

Rowland IR, Grasso P. 1975. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. Appl Microbiol 29(1): 7-12.

Santé Canada. 1987. Le nitrate et le nitrite. Disponible à: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/nitrate\\_nitrite/index-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/nitrate_nitrite/index-fra.php) [Consulté le 2 Février 2008].

Santé Canada. 1994. L'évaluation du risque à la santé humaine des substances d'intérêt prioritaire. Disponible à: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/approach/index-fra.php> [Consulté le 2 Août 2008].

Santé Canada. 2004a. Codification ministérielle de la *Loi sur les aliments et drogues* et du *Règlement sur les aliments et drogues*. Titre 16, Tableau XI. Disponible à: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/acts-lois/fda-lad/index-fra.php> [Consulté le 13 Juillet 2008].

Santé Canada. 2004b. L'évaluation du risque pour les lieux contaminés fédéraux au Canada - Partie I : L'évaluation quantitative préliminaire des risques (ÉQPR) pour la santé humaine. Disponible à: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contamsite/part-partie\\_i/index-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contamsite/part-partie_i/index-fra.php) [Consulté le 20 Juillet 2008].

Schorah CJ, Sobala GM, Sanderson M. 1991. Gastric juice ascorbic acid: effects of disease and implications for gastric carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 53: 287S-293.

Shank RC, Newberne PM. 1976. Dose-reponse study of the carcinogenicity of dietary sodium nitrite and morpholine in rats and hamsters. *Food Cosmet Toxicol* 14: 1-8.

Shephard SE, Schlatter C, Lutz WK. 1987. Assessment of the risk of formation of carcinogenic N-nitroso compounds from dietary precursors in the stomach. *Food Chem Toxicol* 25(1): 91-108.

Siddiqi M, Kumar R, Kaul D, Spiegelhalder B, Preussmann R. 1992. Salivary nitrate and nitrite concentrations from a sample population of children and adults in high risk area for esophageal and gastric cancers in Kashmir, India. *Cancer Lett* 64: 133-136.

Simoneau M. 2005. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière l'Assomption: faits saillants 2001-2003. D. d. s. d. l. é. d. l'environnement. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs: 14p.

Sobala GM, Schorah CJ, Sanderson M, Dixon MF, Tompkins DS, Godwin P, et al. 1989. Ascorbic acid in the human stomach. *Gastroenterology* 97(2): 357-363.

Spiegelhalder B, Eisenbrand G, Preussmann R. 1976. Influence of dietary nitrite on nitrite content of human saliva: possible relevance to *in vivo* formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* 14: 545-548.

Steindorf K, Schlehofer B, Becher H, Hornig G, Wahrendorf J. 1994. Nitrate in drinking water. A case-control study on primary brain tumors with an embedded drinking water survey in Germany. *Int J Epidemiol* 23(3): 451-457.

Suzuki H, Iijima K, Scobie G, Fyfe V, McColl KEL. 2005. Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut* 54(11): 1527-1535.

Suzuki H, Lijima L, Moriya A, McElroy K, Scobie G, Fyfe V, et al. 2003. Conditions for acid catalysed luminal nitrosation are maximal at the gastric cardia. *Gut* 52: 1095-1101.

Swissa M, Shaked Y, Garty M. 2007. Severe methemoglobinemia and syncope in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Israel Medical Association Journal* 9: 684-685.

Tannenbaum SR, Wishnok JS, Leaf CD. 1991. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 53(Suppl): 247S-250S.

Tricker AR. 1997. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 6: 226-268.

Turek B, Hlavsova D, Tucek J, Waldman J, Cerna J. 1980. The fate of nitrates and nitrites in the organism. *IARC Sci Publ* 31: 625-632.

U.S.EPA. 2002a. Integrated Risk Information System (IRIS): Nitrate (CASRN 14797-55-8). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Disponible à: <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0076.htm> [Consulté le 25 Août 2008].

U.S.EPA. 2002b. National primary drinking water regulations. Part 141.23. U.S Environmental Protection Agency. Disponible à: [http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2002/julqtr/pdf/40cfr141.23.pdf](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/julqtr/pdf/40cfr141.23.pdf) [Consulté le 30 Juin 2008].

U.S.EPA. 2006. Consumer Factsheet on: Nitrates/Nitrites. National Primary Drinking Water Regulations. U.S. Environmental Protection Agency. Disponible à: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-ioc/nitrates.html> [Consulté le 1 Janvier 2008].

U.S.EPA. 2008. Consumer Factsheet on: Nitrates/Nitrites. U.S. Environmental Protection Agency. Disponible à: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-ioc/nitrates.html> [Consulté le 13 Août 2008].

van Grinsven HJM, Ward MH, Benjamin N, de Kok TM. 2006. Does the evidence about health risks associated with nitrate ingestion warrant an increase of the nitrate standard for drinking water? *Environmental Health: A Global Access Science Source* 5: 26.

van Loon AJ, Botterweck AA, Goldbohm RA, Brants HA, van Klaveren JD, van den Brandt PA. 1998. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer* 78:129–135.

van Maanen JMS, van Dijk A, Mulder K, de Baets MH, Menheere PCA, van der Heide D, et al. 1994. Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicol Lett* 72: 365-374.

Vermeer ITM, van Maanen JMS. 2001. Nitrate exposure and the endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. *Rev Environ Health* 16(2): 105-113.

vermeer ITM, Moonen E, J. C., Dallinga JW, Kleinjans JCS, van Maanen JMS. 1999. Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res* 428: 353-361.

Walker R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 7(6): 717-768.

Walton G. 1951. Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrate contaminated water. *Am J Publ Health*. 41: 986-996

Ward MH, Mark SD, Cantor KP, Weisenburger DD, Correa- Villaseñor A, Zahm SH. 1996. Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology* 7:465-471.

Ward MH, Cantor KP, Riley D, Merkle S, Lynch CF. 2003. Nitrate in public water supplies and risk of bladder cancer. *Epidemiology* 14:183-190.

Ward MH, Cantor KP, Cerhan J, Lynch CF, Hartge P. 2004. Drinking water nitrate and cancer: results from recent studies in the Midwestern United States [Abstract]. *Epidemiology* 15:S214.

Ward MH, Rusiecki JA, Lynch CF, Cantor KP. 2007. Nitrate in public water supplies and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Causes Control* 18(10): 1141-1151.

Weyer PJ, Smith BJ, Feng ZF, Kantamneni JR, Riley DG, Weyer PJ, et al. 2006. Comparison of nitrate levels in raw water and finished water from historical monitoring data on Iowa municipal drinking water supplies. *Environ Monit Assess* 116(1-3): 81-90.

Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, Hallberg GR, Katamneni J, Breuer G, et al. 2001. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa women's health study. *Epidemiology* 11: 327-338.

Yamamoto K, Nakajima A, Eimoto H, Tsutsumi M, Maruyama H, Denda A, et al. 1989. Carcinogenic activity of endogenously synthesized N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats administered bis(2-hydroxypropyl)amine and sodium nitrite. *Carcinogenesis* 10(9): 1607-1611.

Yang CY, Cheng MF, Tsai SS et Hsieh YL. 1998. Calcium, magnesium, and nitrate in drinking water and gastric cancer mortality. *Jpn J Cancer Res.* 89 (2): 124-130.

## **7. ANNEXES**

**ANNEXE 1**

**Article scientifique:** Modeling cancer risk associated with nitrates in public drinking water systems from four rural regions of Quebec (Canada)

**Auteurs :** Sandrine Chébékoué, Patrick Levallois, Manuel Rodriguez, Robert Tardif

**Rôle de chacun des auteurs :**

- Sandrine Chébékoué : étudiante
- Robert Tardif : directeur de recherche principal
- Patrick Levallois : co-directeur principal
- Manuel Rodriguez : co-directeur associé au projet



## ANNEXE 2

**Tableau 1** Concentrations de nitrates dans les divers réseaux des régions étudiées, qui sont alimentés en eau souterraine

Régions	Concentrations de nitrates (mg-N/L)					
	Moyenne	DS	Min	Max	p50	p95
E	0,37	0,05	0,02	4,3	0,15	1,28
F	0,26	0,58	0,02	5,7	0,05	0,76
G	0,47	0,98	0,01	6,9	0,09	2,13

DS : déviation standard; p50 : 50<sup>e</sup> centile; p95 : 95<sup>e</sup> centile.

## ANNEXE 3

Tableau 2 Apport quotidien total en amines (mg/jour)

Amines	Apport quotidien total		
	Moyenne	DS	p95
n-propylamine (0.01‡)	0,11	0,14	0,36
Éthanolamine (0.01‡)	0,36	0,26	0,62
Pipéridine (0.00045*)	0,08	0,17	0,36
Pyrrolidine (0.005*)	0,23	0,68	1,15

DS : déviation standard; p95 : 95<sup>e</sup> centile

‡: Constante de nitrosation K au pH optimal des amines, arbitrairement octroyé comme étant égal au K du diéthylamine

\*: K tirés de Mirvish 1975

## ANNEXE 4

**Table 3** Estimation des excès de risque de cancer.

Régions	Nitrosamines					
	NDELA (2,8)			N-n-PPA (7)		
	Moyenne	P50	p95	Moyenne	p50	p95
A	$4,7 \times 10^{-10}$	$6,7 \times 10^{-11}$	$1,9 \times 10^{-9}$	$3,6 \times 10^{-10}$	$3,5 \times 10^{-11}$	$1,4 \times 10^{-9}$
B	$6,7 \times 10^{-9}$	$9,5 \times 10^{-10}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$5,2 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-10}$	$2,0 \times 10^{-6}$
C	$2,3 \times 10^{-11}$	$3,3 \times 10^{-12}$	$9,2 \times 10^{-11}$	$1,4 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-11}$	$5,4 \times 10^{-10}$
D	$5,6 \times 10^{-9}$	$7,9 \times 10^{-10}$	$2,2 \times 10^{-8}$	$4,3 \times 10^{-9}$	$4,2 \times 10^{-10}$	$1,6 \times 10^{-8}$
E	$7,9 \times 10^{-11}$	$1,1 \times 10^{-11}$	$3,1 \times 10^{-10}$	$6,1 \times 10^{-11}$	$5,9 \times 10^{-12}$	$2,3 \times 10^{-10}$
F	$4,1 \times 10^{-10}$	$5,8 \times 10^{-11}$	$1,6 \times 10^{-9}$	$3,2 \times 10^{-10}$	$3,1 \times 10^{-11}$	$1,2 \times 10^{-9}$
G	$2,8 \times 10^{-10}$	$4,0 \times 10^{-11}$	$1,1 \times 10^{-9}$	$2,2 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-11}$	$8,2 \times 10^{-10}$

Entre parenthèse sont les indices de potentiel cancérigène  $q_{\text{humain}}$ ; NDELA : N-nitrosodiéthanolamine; N-n-PPA : N-nitroso-n-propylamine; p50 : 50<sup>e</sup> centile; p95 : 95<sup>e</sup> centile.

**Table 3** (suite)

Régions	Nitrosamines					
	NPIP (9,4)			NPYR (2,1)		
	Moyenne	P50	p95	Moyenne	p50	p95
A	$1,0 \times 10^{-11}$	$7,1 \times 10^{-13}$	$3,6 \times 10^{-11}$	$7,4 \times 10^{-11}$	$3,8 \times 10^{-12}$	$2,2 \times 10^{-10}$
B	$1,4 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-11}$	$5,1 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-9}$	$5,4 \times 10^{-11}$	$3,2 \times 10^{-9}$
C	$3,9 \times 10^{-12}$	$2,8 \times 10^{-13}$	$1,4 \times 10^{-11}$	$2,9 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-12}$	$8,7 \times 10^{-11}$
D	$1,2 \times 10^{-10}$	$8,4 \times 10^{-12}$	$4,3 \times 10^{-10}$	$8,7 \times 10^{-10}$	$4,5 \times 10^{-11}$	$2,7 \times 10^{-9}$
E	$1,7 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-13}$	$6,1 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-11}$	$6,4 \times 10^{-13}$	$3,8 \times 10^{-11}$
F	$8,8 \times 10^{-12}$	$6,2 \times 10^{-13}$	$3,2 \times 10^{-11}$	$6,4 \times 10^{-11}$	$3,3 \times 10^{-12}$	$2,0 \times 10^{-10}$
G	$6,0 \times 10^{-12}$	$4,2 \times 10^{-13}$	$2,1 \times 10^{-11}$	$4,4 \times 10^{-11}$	$2,3 \times 10^{-12}$	$1,3 \times 10^{-10}$

NPIP : N-nitrosopipéridine; NPYR : N-nitrosopyrrolidine.

## ANNEXE 5 : analyse de sensibilité

**Tableau 4** Analyse de sensibilité

Paramètres du modèle	Contribution à la variance du modèle			Coefficients Corrélation		
	NPPA	NPIP	NPYR	NPPA	NPIP	NPYR
AQTam	31	42	51	0,39	0,47	0,52
Tie	51	43	36	0,50	0,47	0,44
TR	18	15	13	0,29	0,28	0,26

AQTam : apport quotidien en amines, Tie : Taux d'ingestion d'eau, TR : taux de transformation, NPPA : N-nitroso-n-propylamine, NPIP :N-nitrosopipéridine, NPYR :N-nitrosopyrrolidine.