



anses

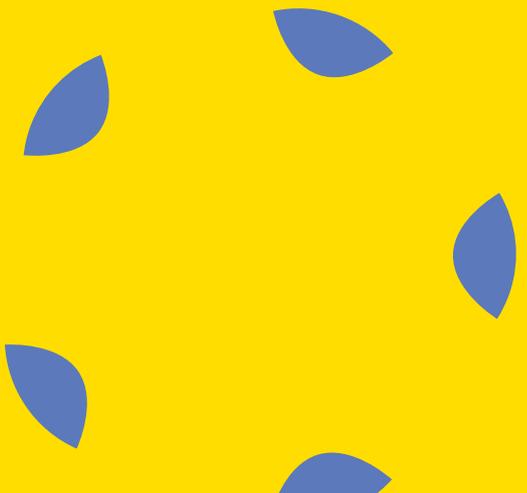
Valeurs sanitaires
de référence

Actualisation des données relatives aux substances phytopharmaceutiques de la famille des SDHI

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2023

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 17 novembre 2023

AVIS

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

relatif à « Actualisation des données relatives aux substances phytopharmaceutiques de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) »

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est autosaisie le 06 décembre 2019 pour actualiser les données de la littérature scientifique publiées depuis l'approbation des substances fongicides de la famille des SDHI afin d'identifier si des éléments nouveaux pouvaient, d'une part, nécessiter une mise à jour de son avis de janvier 2019 et du rapport du groupe d'expertise collective associé et, d'autre part, justifier une modification des évaluations réglementaires menées au niveau européen sur les substances de la famille des SDHI (Annexe 2).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

À la suite d'une alerte d'un collectif de scientifiques concernant les risques pour la santé humaine que pourrait présenter l'utilisation de fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), l'Anses s'est autosaisie le 24 mai 2018 afin de déterminer si les informations et hypothèses scientifiques mentionnées par ces scientifiques apportaient, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives fongicides concernées. Le 14 janvier 2019, l'Anses publiait un avis qui concluait que les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte n'apportaient pas d'élément en faveur de l'existence d'une alerte sanitaire pouvant conduire au retrait des autorisations de mise sur le marché de ces fongicides (Anses 2019). L'Anses lançait cependant un appel à la vigilance aux niveaux européen et international, et soulignait la nécessité de renforcer la recherche sur de potentiels effets toxiques liés à l'inhibition de la succinate déshydrogénase chez l'humain.

Le 6 décembre 2019, l'Anses s'est autosaisie pour actualiser les données de la littérature scientifique sur les substances de la famille des SDHI.

Cette expertise se focalise sur l'identification et la caractérisation des dangers, *via* l'analyse des données de la littérature et des valeurs toxicologiques de référence (VTR) existantes pour ces substances. Cette expertise ne comprend pas d'estimation des expositions et risques associées à celles-ci.

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier, à la lumière des connaissances disponibles, un risque pour la santé humaine. Elle documente le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire néfaste. En pratique, la construction de la VTR comprend notamment les étapes suivantes, pour une voie (ingestion, inhalation, ...) et un type d'exposition (court, moyen ou long terme) donnés :

- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique sur la base d'un profil toxicologique, l'effet critique correspondant à un effet néfaste dûment caractérisé apparaissant à la dose la plus faible ;
- choisir une étude permettant généralement d'établir une relation dose – réponse, appelée étude clé ;
- dans cette étude, identifier la dose la plus élevée sans effet toxique appelée dose critique;
- appliquer des facteurs d'incertitude à cette dose critique (par exemple pour prendre en compte la variabilité interespèce ou interindividuelle).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise relève du domaine de compétences de deux comités d'experts spécialisés (CES) : « Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle » (CES phyto BC) et « Valeurs

sanitaires de référence » (CES VSR). L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail SDHI (GT SDHI) mis en place en octobre 2020, après un appel à candidatures ouvert¹. Les travaux ont été présentés aux CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre décembre 2020 et juillet 2023.

Ces travaux sont ainsi issus de collectifs d'experts aux compétences complémentaires.

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

S'agissant des travaux du GT, celui-ci a procédé à l'analyse des données et études prises en compte dans les dossiers réglementaires, à une revue systématique de la littérature et, en tant que de besoin, à des auditions.

Le rapport a été validé par le GT SDHI lors des séances des 14, 17 et 18 avril 2023. Des experts ont quitté le groupe avant la fin des travaux et sont mentionnés comme contributeurs jusqu'à la date de leur démission, celle-ci précédant la validation finale. Dans cette période de validation, des positions divergentes ont été formulées par des membres du GT SDHI sans qu'il ne soit possible d'arriver à un consensus au sein du GT pour les résoudre, mais sans faire obstacle à sa conclusion. Ces positions divergentes figurent dans le rapport du GT. Elles ont été portées à connaissance des CES en amont de leurs propres conclusions.

Au cours des travaux du GT SDHI, un ensemble de contributions a été proposé par certains experts. Dans la mesure où elles contiennent des informations additionnelles en lien avec les questions de la saisine, elles figurent pour des raisons de transparence à la suite des annexes du rapport. Elles ont été mises à disposition des CES pour information, bien qu'elles n'aient pas fait l'objet, pour des raisons calendaires, d'une validation par l'ensemble du GT. De même, elles n'ont pas fait l'objet d'une validation par les CES.

Le rapport du GT SDHI, ses conclusions et recommandations ont été proposés dans une version finalisée, pour validation auprès des CES de rattachement : le 11 mai au CES VSR et le 6 juin au CES phyto BC. Les conclusions des CES figurent dans la partie 3 du présent avis.

De plus, l'Agence a considéré que l'une des positions divergentes émises par deux experts du GT ne portait pas sur une divergence scientifique, mais interrogeait le processus d'expertise lui-même (Annexe 5). Aussi, après en avoir pris connaissance, elle l'a examinée à l'aune des principes fondamentaux de l'expertise à l'Anses², et rend compte de son analyse dans l'annexe 6 au présent avis.

¹ <https://www.anses.fr/fr/content/appel-%C3%A0-candidatures-d%E2%80%99experts-scientifiques-afin-de-proc%C3%A9der-%C3%A0-la-constitution-d%E2%80%99un-group-1>

² Principes fondamentaux et points clés de l'expertise collective à l'Anses (Novembre 2012) <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-Ft-PrincipesExpertise.pdf>

Au vu du rapport et des conclusions du GT SDHI, des conclusions du CES phyto BC et du CES VSR, l'Agence a formulé ses conclusions et recommandations, qui figurent au paragraphe 4 du présent avis.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ET DES CES

3.1. Analyse et conclusions du GT

3.1.1. Méthodologie

Les questions posées au GT SDHI sont les suivantes :

- *l'analyse des éléments disponibles ou à venir,, notamment les effets critiques, la pharmacocinétique doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances ? A cet égard, une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI ;*
- *l'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances ?*
- *au regard de ces éléments, si des modifications des valeurs toxicologiques de référence (VTR) des substances SDHI sont considérées nécessaires, des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen.*

Pour les substances phytopharmaceutiques, trois types de VTR sont principalement définies dans les dossiers réglementaires :

- l'AOEL (Acceptable Operator Exposure Level, ou niveau acceptable d'exposition de l'opérateur), qui fixe le niveau acceptable d'exposition pour les opérateurs, les travailleurs, les résidents et les personnes présentes. Il s'agit de la quantité maximale de substance active (SA) à laquelle ces populations peuvent être exposées quotidiennement, sans effet dangereux pour leur santé ;
- la dose journalière admissible (DJA) (ou Acceptable Daily Intake, ADI) est une estimation de la quantité de SA présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation ;
- l'ARfD (Acute Reference Dose) ou dose de référence aiguë est la quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée sur une brève période, en général au cours d'un repas ou d'une journée, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation.

Pour répondre à la saisine, le GT SDHI a suivi la méthodologie décrite dans la figure ci-dessous.

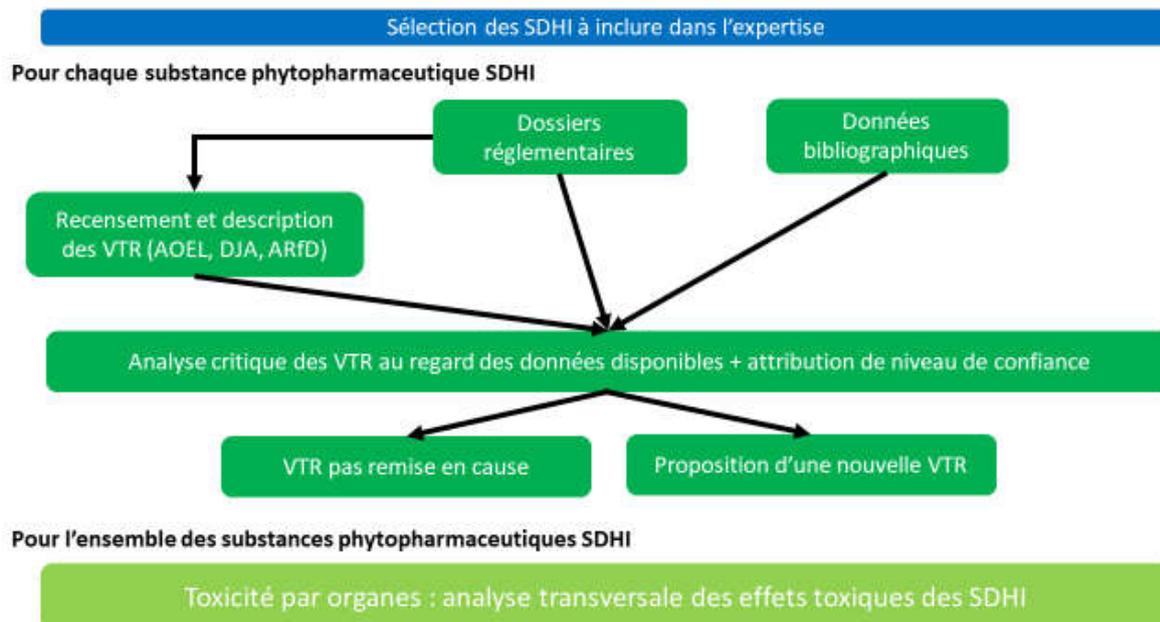


Figure 1 : Méthode de travail suivie par le GT SDHI

La description et l'analyse critique des VTR ont été réalisées, à partir des dossiers réglementaires et d'une revue systématique de la littérature afin d'identifier si des données pertinentes pour l'élaboration des VTR étaient disponibles. Ainsi, l'objectif de cette expertise n'était pas de réaliser un profil toxicologique complet de chacune des substances.

Le GT a analysé les choix réalisés pour élaborer ces VTR en se focalisant sur :

- la qualité des études clés,
- une analyse de la pertinence des effets critiques retenus,
- le choix de la dose critique.

Le GT s'est en particulier assuré que les doses critiques utilisées comme points de départ des VTR étaient les plus conservatrices au regard de l'ensemble des études pertinentes pour leur dérivation.

De plus, il a qualifié les VTR confirmées ou faisant l'objet de propositions alternatives à l'aide d'un niveau de confiance, en appliquant le guide méthodologique de l'Anses (Anses, 2017).

3.1.2. Sélection des substances actives phytopharmaceutiques SDHI, des usages autorisés et données de vente

Le GT s'est intéressé à 14 substances actives (SA) de la famille des SDHI (13 fongicides et 1 acaricide).

Il s'agit des substances ayant fait l'objet d'une évaluation européenne disponible au moment des travaux. Pour ces SDHI, les statuts réglementaires et les principaux usages ont été recensés (Annexe 3).

La figure ci-dessous présente les chiffres de vente déclarés de produits phytopharmaceutiques contenant des SA SDHI sur la période 2008-2020 en France (extraction des données à partir

de la banque nationale des ventes de produits phytosanitaires, BNV-D, réalisée le 24/06/22). Il n'est pas enregistré de données de vente dans la BNV-D pour le cyflumetofen, l'isopyrazam, le penflufen et le pydiflumetofen.

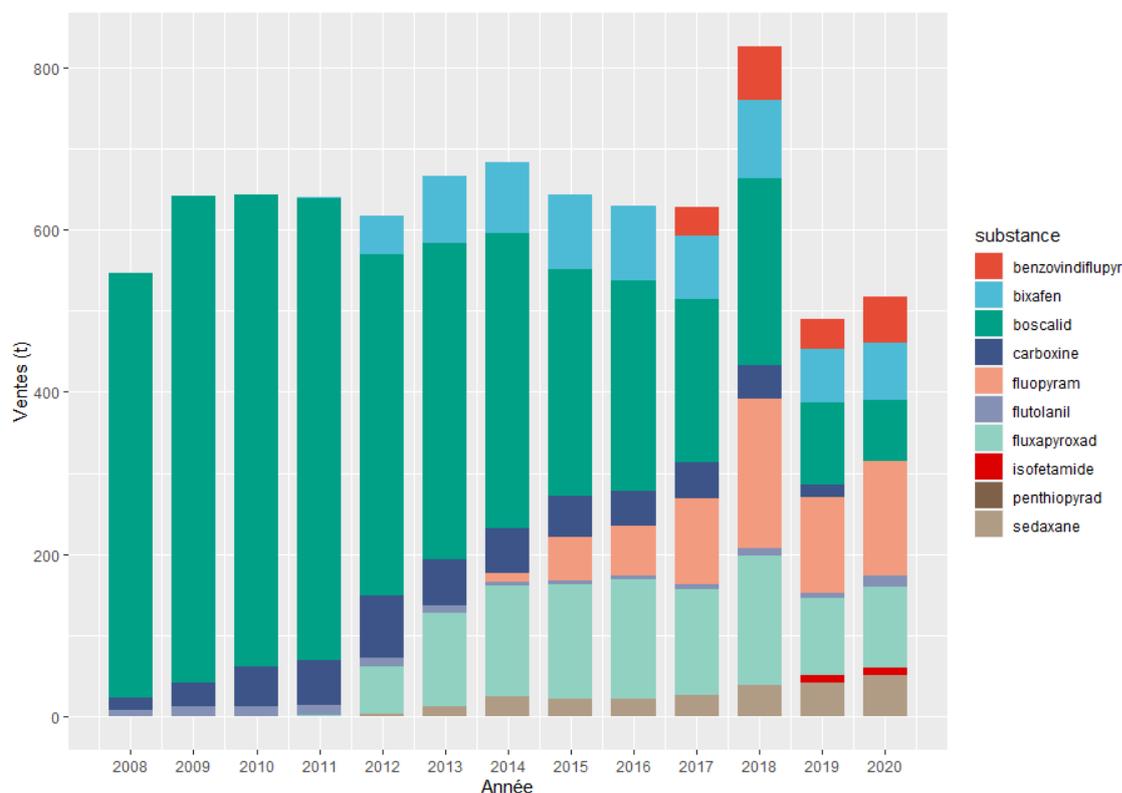


Figure 2 : Ventés de produits à base d'une SA de la famille des SDHI entre 2008 et 2020 en France (en tonnage de SA et par année de vente)

3.1.3. Biochimie de la succinate déshydrogénase (SDH)

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des hématies. Elles assurent la production d'énergie sous la forme d'ATP par le processus de phosphorylation oxydative. Elles jouent ainsi un rôle prépondérant dans le fonctionnement des organes à forte demande énergétique, tels que le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les reins, le foie, etc. La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne, est le siège de la phosphorylation oxydative. Cette voie métabolique met en jeu cinq complexes enzymatiques (Complexes I à V) (Figure 3).

Cette expertise se focalise sur le complexe II et sur les fonctions de la SDH. La SDH ou complexe II mitochondrial catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Cette réaction fait partie du métabolisme oxydatif des substrats carbonés.

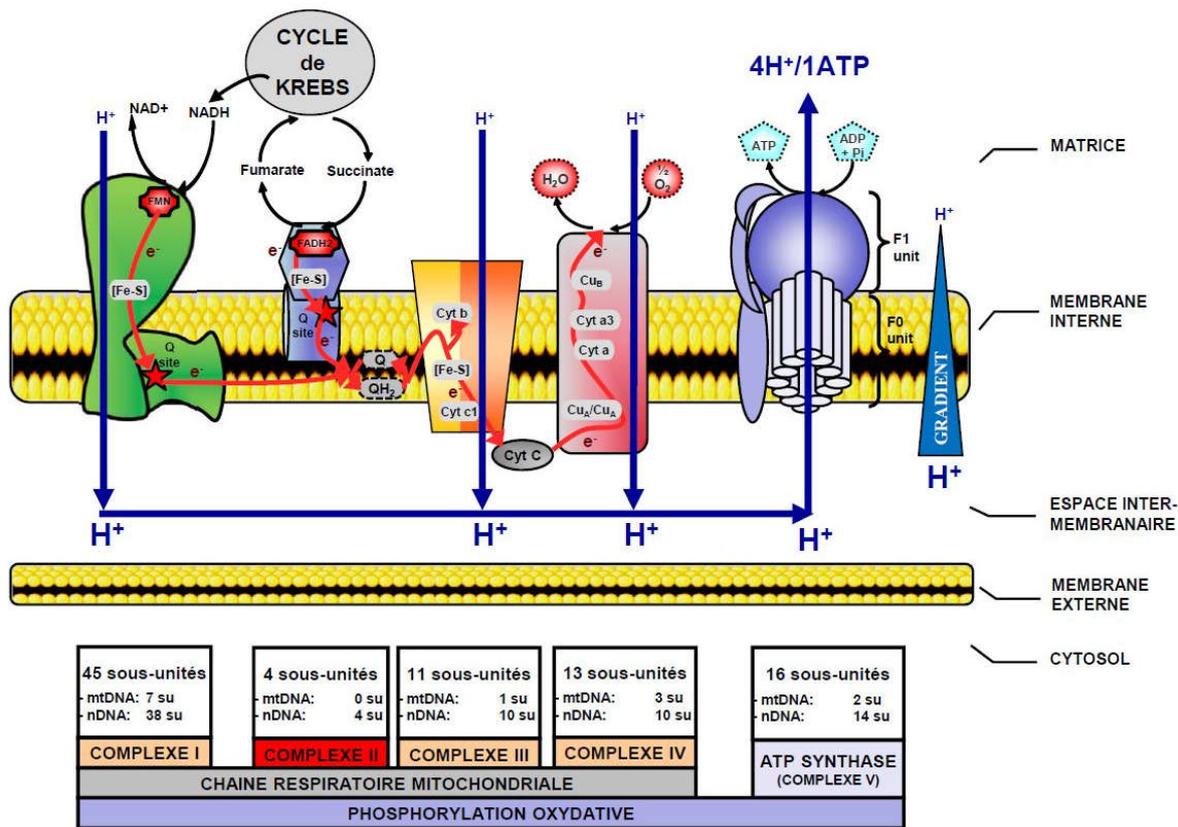


Figure 3 : Schéma de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative au sein de la mitochondrie, adapté de (Lemarie et Grimm 2011)

Il existe deux mécanismes à l'origine d'un dysfonctionnement de la SDH : d'une part des mutations dans l'un des gènes SDHx et d'autre part, l'inhibition de l'enzyme par des xénobiotiques.

Concernant l'inhibition par des xénobiotiques, la bibliographie a mis en évidence deux inhibiteurs non pesticides, le malonate, inhibiteur compétitif du succinate, et l'acide 3-nitropropionique (3-NP) dont l'inhibition est irréversible. Ces substances hydrophiles se lient à la sous-unité SDHA. Les autres inhibiteurs sont des molécules de plus grande taille, plutôt hydrophobes, qui se lient à la poche de l'ubiquinone tels que le TTFA (2-thényltrifluoroacétone) et les pesticides SDHI.

3.1.4. Analyse des VTR issues de l'évaluation européenne des substances actives

3.1.4.1. Données de toxicocinétique

Les SA SDHI sont absorbées, après exposition par voie orale, dans une proportion variant de 50 à 95%.

Elles sont rapidement distribuées dans tous les tissus de l'organisme. La distribution comprend à la fois les substances parentes et leurs métabolites, car ces derniers n'ont pas été distingués et quantifiés dans ces études. Les organes dans lesquels on retrouve les concentrations les plus élevées de SA et/ou de métabolites sont en général le foie et les reins, suivis du tractus gastro-intestinal.

La quantité métabolisée peut varier suivant les composés SDHI. De manière générale, ils sont très métabolisés comme en témoigne la présence de nombreux métabolites dans les urines et les fèces. Des pourcentages plus importants de SDHI dans les fèces peuvent s'expliquer par la fraction non absorbée du composé parent à de fortes concentrations.

Plus de 80% de la quantité administrée, suivie par radiomarquage, est éliminée dans les 48 à 72 heures suivant l'exposition, ce qui suggère une élimination importante et rapide de l'organisme. La substance active et/ou ses métabolites sont préférentiellement éliminés dans les fèces entre 80 et 90% et entre 10 et 15% dans les urines. L'élimination pour certaines substances SDHI est dose-dépendante, mais il est impossible de distinguer si cela est dû à une saturation métabolique ou encore à une limitation dans l'élimination causée par une rétention tissulaire.

3.1.4.2. Analyse des VTR

La revue de la littérature n'a pas permis d'identifier d'études, pouvant être utilisées pour dériver une VTR. Ces VTR se basent donc sur des données expérimentales présentées dans les dossiers réglementaires.

Concernant les données épidémiologiques, l'expertise de l'Inserm (2021) a constaté qu'il n'existait à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets des SA SDHI sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La recherche bibliographique réalisée par le GT n'a pas permis d'identifier de données supplémentaires, et en particulier produites postérieurement aux travaux de l'Inserm.

Sur les 39 VTR disponibles pour les 14 substances analysées, le GT a proposé de modifier 11 VTR :

- les AOEL pour le benzovindiflupyr, le cyflumetofen et l'isofetamid ;
- les DJA pour la carboxine, le cyflumetofen, le fluopyram, l'isopyrazam et le penthiopyrad ;
- les ARfD pour le cyflumetofen, le penflufen et le pydiflumetofen.

Les raisons pour proposer des nouvelles valeurs portent principalement sur une remise en question du choix de l'étude clé ou de la dose critique (par exemple, une NOAEL établie dans le dossier est considérée comme une LOAEL par le GT) mais aussi sur le choix de l'effet critique ou des incertitudes liées à la qualité de l'étude clé. Les VTR actuelles et proposées par le GT sont décrites en annexe de cet avis (Annexe 4).

Parmi ces substances, le GT note que la carboxine et l'isopyrazam ne sont plus des substances actives approuvées au titre du règlement (CE) n°1107/2009. De plus, la demande d'approbation du pydiflumetofen est toujours en cours d'évaluation au niveau européen.

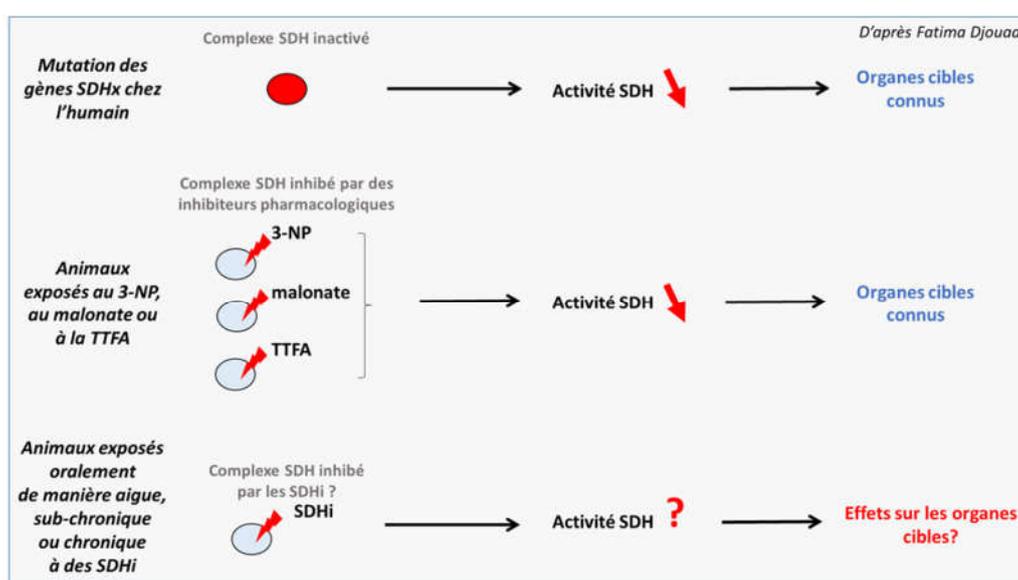
Des positions divergentes ont été formulées concernant les VTR suivantes (Annexe 5 du rapport) :

- DJA du bixafen ;
- ARfD du cyflumetofen ;
- DJA du fluopyram ;
- ARfD du penthiopyrad.

3.1.5. Dysfonctionnement de la SDH, pathologies et organes cibles

Le GT s'est intéressé aux effets observés suite à une inactivation génétique de la SDH ou une inhibition chimique par des inhibiteurs non phytopharmaceutiques.

Selon le GT, ces connaissances permettent de faire des analogies entre les effets d'une inactivation par mutation de la SDH et les effets d'une inhibition chimique de la SDH. Ce raisonnement par analogie est schématisé dans la Figure 4 mais ne permet pas d'extrapoler les effets et maladies associées à une inactivation de la SDH directement aux effets induits par les SDHI, en raison de plusieurs limites : d'une part, une inhibition transitoire de l'enzyme lors des périodes d'exposition aux SDHI, d'autre part, le caractère pléiotropique³ des atteintes observées lors d'une inactivation génétique de la SDH.



Des mutations ou variants pathogènes, qui affectent les gènes *SDHx* et provoquent une inhibition du complexe II, peuvent donner :

- soit un déficit primaire en complexe II, c'est-à-dire un déficit héréditaire avec des mutations germinales transmises à la descendance. Il s'agit de maladies rares appartenant à la grande famille des maladies mitochondriales, touchant principalement les muscles, dont le cœur et le système nerveux central ;
- soit une susceptibilité à certains cancers qui se développent lorsqu'une mutation héréditaire hétérozygote dans un des gènes *SDHx* est associée à une mutation ou délétion du second allèle somatique.

Sur cette base, le GT a émis l'hypothèse d'une sensibilité particulière aux SDHI des sujets portant une mutation à l'état hétérozygote. Les mutations ont pour conséquence de déstabiliser les protéines ce qui conduit, en général, à une diminution de l'activité enzymatique de la SDH, variable d'un individu à l'autre. La relation entre le degré d'inactivation de l'enzyme

³ Faculté pour un gène de déterminer plusieurs caractères

et le degré d'inhibition de la respiration mitochondriale n'est pas connue. Les individus hétérozygotes possèdent à la fois une forme mutée du complexe enzymatique SDH et une forme normale, avec pour conséquence une activité SDH diminuée. Chez ces sujets, l'altération de l'activité SDH résiduelle pourrait être accentuée par une inhibition par les SDHI, et conduire, comme chez les individus porteurs d'une mutation à l'état homozygote, à une accumulation de succinate, évènement majeur dans l'établissement du phénotype tumoral.

Par ailleurs, le GT a investigué les effets neurologiques liés à une exposition aux SDHI non pesticides. L'ensemble des données expérimentales concernant le 3-NP et le malonate montre globalement une vulnérabilité particulière du striatum avec une symptomatologie motrice, qui paraît au moins partiellement liée à l'inhibition de l'activité SDH. La spécificité striatale de la neurotoxicité n'est cependant pas absolue. Le TTFA, plus proche des pesticides SDHI que le 3-NP et le malonate en termes de cible moléculaire dans la chaîne mitochondriale, induit des atteintes du système nerveux dopaminergique chez des souris.

3.1.6. Toxicité par organes

L'autosaisine indiquait qu'« *une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI* ». Le GT a ainsi réalisé une analyse transversale des effets toxiques communs à plusieurs SDHI étudiés au regard de la toxicité mitochondriale afin de permettre une comparaison de leur toxicité par organe ou par système.

Concernant le foie, les études expérimentales analysées dans les dossiers réglementaires indiquent que l'exposition à la plupart des SDHI induit des effets hépatiques. Ces effets se caractérisent principalement par une hypertrophie des hépatocytes avec une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques. Cette atteinte hépatique est souvent associée à une atteinte thyroïdienne. En particulier, pour 11 SDHI (benzovindiflupyr, bixafen, boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, isofetamid, isopyrazam, penflufen, penthiopyrad, pydiflumetofen, sedaxane), l'atteinte hépatique est retenue comme effet critique dans l'élaboration d'une VTR (AOEL ou DJA). Plusieurs SDHI ont induit des tumeurs hépatiques à des doses supérieures à celles retenues pour établir les VTR. D'après les dossiers réglementaires revus par le GT, l'induction des enzymes du métabolisme hépatique suite à une exposition aux SDHI repose sur l'activation de récepteurs, tout particulièrement CAR (constitutive androstane receptor) / PXR (pregnane X receptor).

Une position divergente a été formulée sur cette partie (voir annexe 5 du rapport).

Concernant la toxicité sur la thyroïde, les études expérimentales analysées dans les dossiers réglementaires indiquent que l'exposition à la plupart des SDHI induit des effets thyroïdiens. Diverses perturbations de la thyroïde sont retrouvées de façon isolée ou associée : augmentation du poids relatif de la glande, hypertrophie et/ou hyperplasie, altération du colloïde... Pour 7 SDHI (benzovindiflupyr, bixafen, boscalid, fluopyram, flutolanil, penflufen, sédaxane), l'atteinte thyroïdienne est retenue comme effet critique dans l'élaboration d'une VTR (AOEL ou DJA). Dans les dossiers réglementaires, il est généralement mis en avant un mécanisme d'action passant par l'activation du récepteur nucléaire CAR pour justifier de la non pertinence des effets thyroïdiens pour l'humain. Cependant, le GT considère que cette conclusion peut être discutée en raison de lacunes expérimentales ou de résultats

incohérents ainsi que de la présence d'effets sur la glande thyroïde observés chez le chien, dont la régulation de la fonction thyroïdienne est proche de celle de l'humain. Cela constitue donc des informations qui mériteraient des investigations complémentaires. Ainsi, chez l'humain, des incertitudes persistent sur une potentielle perturbation de la régulation thyroïdienne.

Une position divergente a été formulée sur cette partie (voir annexe 5 du rapport).

Concernant les surrénales, des effets (histologiques et/ou sur le poids) sont observés pour la majorité des SDHI analysés par le GT. En particulier, des altérations statistiquement significatives et/ou observées dans la majorité des animaux testés dans le cas où le résultat statistique n'est pas spécifié dans le dossier réglementaire (telles que des hypertrophies des zones corticales et/ou glomérulaire, vacuolisation corticale) sont rapportées pour le benzovindiflupyr, le cyflumetofen, le fluopyram, le fluxapyroxad, l'isofétamid, le penthiopyrad. A part pour le cyflumetofen, ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans le cadre de l'élaboration des VTR. Néanmoins, le GT conclut que la toxicité surrénalienne est à considérer avec attention à travers le prisme du mode d'action de ces molécules. Dans ce sens, bien que cet effet apparaisse comme un évènement non significatif, le développement de phéochromocytomes observés en réponse à une exposition au bixafen et au flutolanil est considéré par le GT comme un signal d'alerte, en raison du mécanisme d'action des SDHI et de la susceptibilité que confère l'inactivation de la SDH à développer ce type de tumeurs neuroendocrines chez l'humain.

Concernant le système visuel, les mutations de la SDH affectent le développement oculaire. Des articles récents décrivent des effets délétères sur l'œil en lien avec l'exposition à certains SDHI (bixafen, boscalid, fluxapyroxad, isopyrazam, sédaxane) dans des espèces non mammifères. Par conséquent, le GT s'est particulièrement intéressé aux observations oculaires rapportées dans les études réglementaires, y compris lorsque celles-ci n'étaient pas statistiquement significatives. Ainsi, une atteinte, en particulier de la rétine, est observée pour plusieurs SDHI. Cette atteinte est observée de façon statistiquement significative pour l'isopyrazam (à des doses d'exposition supérieures à celles ayant permis d'établir les VTR actuelles) ou ponctuellement pour d'autres composés et sans significativité statistique (bixafen, cyflumetofen, fluopyram, penthiopyrad). La majorité des atteintes est retrouvée dans les études de toxicité développementale. Il s'agit principalement de microphthalmies et de replis rétinien. Des atteintes ponctuelles sont également mises en évidence à l'âge adulte (pâleur du fond de l'œil, atrophie rétinienne ou dégénérescence du cristallin), suggérant une sensibilité du système visuel tout au long de la vie. Ceci constitue un signal qui nécessiterait des investigations supplémentaires, notamment de la taille des globes oculaires, ainsi qu'une étude de neurotoxicité du développement, pour clarifier la pertinence de ces atteintes.

Concernant le système nerveux, les effets neurologiques des SDHI décrits dans les dossiers réglementaires ont été examinés notamment à la lueur des connaissances sur les effets des SDHI non pesticides (3-NP, malonate et TTFA). En effet, ces substances montrent un effet néfaste sur le striatum ou/et la substance noire chez les rongeurs et les primates, associé à leur mode d'action ciblant le complexe II mitochondrial. Les dossiers réglementaires des SDHI mettent en évidence des troubles neurologiques comportementaux ou moteurs, le plus souvent transitoires et dans des protocoles d'exposition courts. En particulier, la détermination

des ARfD repose sur des effets critiques rapportés dans des études de neurotoxicité aiguë chez le rat pour 4 SDHI (benzovindiflupyr, fluopyram, penflufen et sedaxane). Des manifestations neurologiques sont également observées avec d'autres SDHI mais à des doses plus élevées que celles utilisées dans la détermination de VTR. Le GT note que les études d'exposition sub-chronique ou chronique chez la souris ou le rat ne comportent pas de tests approfondis au regard d'une éventuelle neurotoxicité chronique. En effet, cela nécessiterait non seulement la recherche de déficits comportementaux et moteurs, mais également des investigations neuropathologiques spécifiques. Celles-ci devraient en particulier être de nature à identifier une éventuelle atteinte du système nerveux dopaminergique, atteint de façon ciblée par plusieurs substances chimiques inhibitrices de la SDH.

Concernant le rein, les études réglementaires réalisées avec le benzovindiflupyr, le boscalid, la carboxine, le métabolite B-3 du cyflumetofen, le fluopyram, le flutolanil, l'isofetamid et le penthiopyrad indiquent des atteintes rénales à des degrés variables. A l'exception de la carboxine pour laquelle l'AOEL actuellement en vigueur est basée sur des effets rénaux, ces effets n'ont pas été considérés pertinents pour l'humain dans les dossiers réglementaires sur la base de l'observation d'une accumulation d' α 2u-globuline chez le rat mâle. Néanmoins, le GT a pris en compte ces effets pour proposer la DJA du penthiopyrad. Par ailleurs, le GT note que certains effets sont observés dans d'autres espèces (souris et pour la carboxine, chien) et dans les deux sexes.

Concernant les organes reproducteurs, la reproduction et le développement, certains effets ont été constatés aux doses ayant servi à établir les différentes VTR : diminution de la mobilité des spermatozoïdes exclusivement pour le benzovindiflupyr, diminution du poids foetal pour le bixafen et le penthiopyrad, pertes implantatoires et résorptions fœtales pour le flutolanil et le fluxapyroxad, variations squelettiques pour l'isofetamid et le pydiflumetofen. Ainsi, les effets délétères pour la reproduction et le développement, lorsqu'ils sont présents, sont variables en fonction des SDHI et ne permettent pas d'identifier un ou des effets communs. S'agissant de l'isopyrazam, des retards d'ossification et des malformations oculaires sont à l'origine du classement 1B pour la toxicité sur le développement. Concernant le pydiflumetofen, cette substance est classée comme toxique pour la reproduction de catégorie 2 sur la base des retards pubertaires retrouvés dans l'étude sur 2 générations.

Concernant le développement cardiaque, celui-ci n'apparaît pas clairement comme étant une cible des SDHI à des doses utilisées pour l'élaboration des VTR. En effet, des malformations cardiaques ont été rapportées uniquement dans le dossier réglementaire de l'isopyrazam à des doses supérieures à celles ayant servi de base aux VTR. Néanmoins, une toxicité cardiaque est rapportée dans la littérature chez des embryons de poissons zèbres avec le bixafen, la carboxine, le flutolanil et le fluxapyroxad. Ainsi, sur cette base, le GT souligne la nécessité de porter une attention accrue à l'examen du cœur dans les analyses réglementaires.

Concernant le système endocrinien, l'évaluation de la perturbation endocrinienne doit se conformer à la méthodologie du guide de l'ECHA/EFSA dans le cadre de la réglementation sur les substances phytopharmaceutiques (règlement (CE) n°1107/2009) (ECHA, EFSA and JRC et al. 2018). Cependant, les dossiers revus sont antérieurs à la mise en application de ce

document guide et n'ont donc pas investigué suffisamment le potentiel perturbateur endocrinien (PE) des SDHI. Lors de la revue des documents réglementaires par le GT, les dossiers relatifs à certaines substances montrent des effets susceptibles d'être expliqués par un mécanisme de perturbation endocrinienne. Par conséquent, le GT souligne que l'évaluation du potentiel PE de ces substances devra faire l'objet d'une attention particulière lors de leur réévaluation, au regard des effets observés par le GT, notamment sur la thyroïde et les surrénales.

3.1.7. Conclusions du GT

Le GT SDHI a inclus dans l'expertise les SA phytopharmaceutiques SDHI ayant eu une évaluation européenne disponible au moment des travaux, soit 14 SA SDHI.

Conformément aux attendus de la saisine, le GT SDHI a, dans un premier temps, examiné les VTR actuellement en vigueur (AOEL, DJA, ARfD) afin de faire des propositions de modifications si nécessaire. Pour ce faire, il a basé son analyse sur les dossiers réglementaires de 14 substances SDHI et plus particulièrement sur le résumé de l'évaluation de l'Etat membre rapporteur (volume 1) et les données de toxicité et de métabolisme (volume 3B6), le document des conclusions de l'EFSA, ainsi que les opinions du RAC⁴. Selon les besoins, les experts ont eu accès aux documents détaillés des études. Simultanément, une recherche bibliographique des données scientifiques disponibles dans la littérature académique a été entreprise avec comme objectif d'identifier des effets néfastes des SDHI et des mécanismes de toxicité sous-jacents. Il est à rappeler que l'objectif de ce rapport n'est pas de réaliser un profil toxicologique exhaustif de chacune des substances.

L'analyse des 39 VTR examinées pour les 14 composés de la famille des SDHI a conduit le GT à proposer des modifications de VTR pour 11 d'entre elles dont 3 AOEL, 3 ARfD (2 remises en cause et 1 nouvelle proposée) et 5 DJA. Ces modifications sont motivées par une requalification des NOAEL en LOAEL, la sélection d'études clés jugées plus pertinentes ou l'ajout d'un facteur d'incertitude supplémentaire. Ces modifications ont conduit à diminuer ces VTR au minimum d'un facteur 1,5 et au maximum d'un facteur 3,3.

Le GT constate qu'un certain nombre de SDHI agissent sur des organes communs, incluant le système nerveux central et périphérique dont les yeux, les reins, la thyroïde, les surrénales et le foie. En particulier, le GT note des analogies entre les effets induits par une inactivation génétique de la SDH chez l'humain et une toxicité provoquée par les SDHI sur les surrénales. Le GT observe que l'étude du lien entre l'exposition aux SDHI et l'inhibition de la SDH n'est pas un requis réglementaire et est donc absente des dossiers industriels. Par ailleurs, l'analyse de la littérature n'a pas permis de répondre à cette interrogation. Le GT souligne l'importance de développer des AOP (*Adverse Outcome Pathway*) spécifiques résultant d'un déficit mitochondrial en complexe II (voir RECO4).

La revue des VTR par le GT met en évidence des incertitudes, en lien avec les niveaux de confiance, globalement moyens voire moyens faibles, attribués à ces valeurs. Des analyses complémentaires permettraient de mieux caractériser les dangers potentiels et de conforter/modifier les VTR et ainsi réduire les incertitudes (voir RECO1).

⁴ RAC = Risk assessment committee = comité d'évaluation des risques de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA)

Les études toxicocinétiques des dossiers réglementaires des SDHI, réalisées avec un marquage radio-actif, ne permettent pas de différencier le composé parent des métabolite(s) d'intérêt, et donc, d'estimer la distribution par organes. Cela ne permet pas de réaliser des modèles PBPK (physiologically-based pharmacokinetics) génériques (voir RECO3).

De plus, le GT considère que l'évaluation actuelle des SDHI seuls est incomplète. Une évaluation des dangers devrait être réalisée pour les formulations contenant des substances actives ayant un effet sur la chaîne respiratoire et susceptibles d'influencer les effets retrouvés.

Le GT note des lacunes importantes dans certains dossiers réglementaires. Des expérimentations complémentaires de la néphrotoxicité ou de la neurotoxicité y compris durant le développement, lui apparaissant comme nécessaires en raison de signes d'appel (cf. section 8 du rapport du GT). Certaines études expérimentales présentant une mortalité élevée ont été prises en considération lors des évaluations réglementaires alors qu'elles auraient dû être rejetées et donc refaites. Le GT déplore également l'usage inapproprié des contrôles historiques pour rejeter des effets significatifs. Par ailleurs, les dossiers examinés n'ont pas investigué le potentiel perturbateur endocrinien, leur évaluation étant antérieure à la mise en application du document guide de 2018. L'évaluation de la demande de renouvellement de l'approbation de ces substances devrait s'assurer de combler ces lacunes.

En outre, les tests requis lors de l'évaluation des dossiers réglementaires de ces substances n'apparaissent au GT ni adéquats, ni suffisants, pour évaluer la toxicité spécifique des SDHI, au regard des données de la littérature. Ceci conduit le GT à faire des recommandations spécifiques sur le besoin de mettre en œuvre une stratégie de tests visant à évaluer la mitotoxicité et d'adapter certaines lignes directrices de l'OCDE (voir RECO1).

Concernant les données épidémiologiques, l'expertise de l'Inserm de 2021 a constaté qu'il n'existait à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets des substances actives SDHI sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La recherche bibliographique réalisée par le GT n'a pas permis d'identifier des données supplémentaires. Le GT attire l'attention sur la possible vulnérabilité des populations chez lesquelles la chaîne respiratoire est dysfonctionnelle (environ 1 personne sur 4000 en France) en cas d'exposition, notamment professionnelle, à des SDHI.

Enfin, même si l'objet de la saisine ne concernait que les dangers, le GT souligne le manque de données d'exposition et d'imprégnation des populations qui entraînerait des difficultés pour apprécier le risque sanitaire (voir RECO2). De plus, le GT recommande la réalisation d'une expertise relative à l'impact des SDHI sur la biodiversité et la santé des écosystèmes (voir RECO5).

3.1.8.Recommandations du GT

Sur la base des éléments détaillés dans son rapport, le GT recommande de :

Mettre en place une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques (RECO 1)

Le GT recommande le développement d'une stratégie séquentielle pour évaluer le potentiel mitotoxique (RECO1A1 et RECO1A2, RECO1C) et ses conséquences fonctionnelles (RECO1B), mettant en œuvre une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* en s'inspirant de ce qui a été fait par l'US EPA (Hallinger et al. 2020).

Le GT recommande une première évaluation de la mitotoxicité (RECO1A) par la réalisation :

- de trois tests pour évaluer la fonction de phosphorylation oxydative (RECO1A1),
- de tests *in vitro* complémentaires (RECO1A2) si OXPHOS altérée,
- dans le cas d'une mitotoxicité qui ne serait pas en lien avec une inhibition du complexe II, le GT recommande le développement de tests complémentaires spécifiques.

Le GT recommande dans le cas où la batterie de tests proposée dans la RECO1A (RECO1A1 et RECO1A2) identifie une inhibition du complexe II :

- la réalisation, dans des modèles vertébrés adaptés *in vivo*, de tests fonctionnels et analytiques appropriés pour évaluer les effets sur les tissus et organes, en particulier ceux identifiés comme sensibles dans le rapport du GT, disponible par ailleurs en complément de cet avis (en sa section 8) ou dans la littérature (RECO1B) ;
- la réalisation, à l'issue de ces tests *in vivo*, de tests enzymatiques pour évaluer l'activité du complexe II (SQR/SDH) dans les tissus et organes concernés par la RECO1B (RECO1C).

Améliorer les connaissances sur les niveaux d'exposition des populations aux SDHI (RECO 2)

Le GT recommande :

- d'intégrer les SDHI dans les programmes nationaux de biosurveillance ;
- d'introduire les SDHI dans les substances recherchées dans les études d'alimentation totale (EAT), y compris infantile et de coupler ces informations aux études individuelles nationales des consommations alimentaires (INCA) ;
- de soutenir les recherches épidémiologiques à visée étiologique destinées à identifier les effets sanitaires des SDHI, en population générale ou professionnellement exposée, basées sur des mesures objectives d'exposition.

Améliorer les études de pharmacocinétique de manière générale en vue de l'exploitation de données toxicologiques *in vitro* (RECO 3)

Le GT recommande donc d'inclure la quantification des composés d'intérêt de manière à pouvoir distinguer la substance parente de ses métabolites dans les différents tissus, dans les études de toxicocinétique.

- Le GT recommande l'utilisation de la modélisation PBPK pour la prise en compte des processus physiologique ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination), la détermination de l'exposition interne à partir de l'exposition externe et l'estimation des concentrations *in vivo* à partir des concentrations effectives *in vitro*.
- Le GT recommande d'utiliser les mêmes formulations aqueuses pour solubiliser les substances SDHI entre les études de toxicocinétique et les études de toxicité répétée par gavage.
- Le GT recommande de faire une étude intraveineuse en parallèle à l'étude toxicocinétique à dose unique par voie orale.

Favoriser le développement des AOP (« adverse outcome pathway ») (RECO 4)

Dans le but de structurer les informations disponibles à ce jour et d'orienter des stratégies de tests intégrées (Integrated Test Strategy/ITS) pertinentes et adaptées au profil de toxicité des SDHI, le GT recommande :

- de développer un AOP « inactivation de la SDH et cancérogénèse »,
- de développer un AOP « inhibition de la SDH et neurotoxicité » incluant le neurodéveloppement et la neurodégénérescence.

Evaluer les effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité (RECO 5)

Le GT recommande la mise en place d'une expertise collective consacrée spécifiquement aux effets des SDHI et à l'évaluation des risques pour la biodiversité et la santé des écosystèmes.

3.2. Analyse et conclusions des CES

3.2.1. CES Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle

Le rapport du GT SDHI a été validé par le CES « Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle ». Concernant le chapitre « Dysfonctionnement de la SDH, pathologies et organes cibles », une majorité des experts s'est abstenue. Ces abstentions sont le fait d'experts considérant qu'il n'est pas possible de faire des analogies entre les effets d'une inactivation permanente par mutation de la SDH et les effets d'une inhibition chimique de la SDH dont l'intensité et la durée ne sont pas connues. De plus, les inhibiteurs chimiques cités dans le rapport tels que le 3-NP sont d'une nature différente des SDHI, rendant incertaine l'hypothèse de la similitude de leurs mécanismes d'action.

3.2.2. CES Valeurs sanitaires de référence

Le présent avis vise à expliciter la validation partielle par le CES VSR du rapport élaboré par le GT SDHI. Le CES VSR travaille de concert avec les GT qui lui sont rattachés, conformément aux procédures de l'Anses. Quel que soit l'agent chimique ou la substance étudié(e), après avoir pris connaissance du rapport du GT, ce CES demande, le cas échéant, que des précisions soient apportées et/ou suggère des modifications, lorsque les experts du CES considèrent que les données scientifiques disponibles le justifient. Le GT concerné prend en compte les propositions du CES pour établir la version finale du rapport.

Après avoir pris en considération des remarques du CES VSR, le GT SDHI a ainsi établi la version finale de son rapport. Celui-ci n'étant, *de facto*, plus modifiable, le CES VSR après en avoir pris connaissance, a choisi de ne pas l'endosser dans sa globalité et de n'en valider que certaines parties pour les raisons décrites ci-dessous.

Les chapitres 1 à 5 sont validés par le CES VSR. Cependant, il note que l'utilisation de l'icône de « tête de mort » dans la figure 14 du chapitre 3, suggérant un effet toxicologique mortel pour les personnes exposées, est inadaptée. La figure 11 de l'article de F. Bouillaud (*membre du GT SDHI*) de 2023⁵ décrivant les effets supposés de différents niveaux d'inhibition des

⁵ Bouillaud, F. Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Pesticides (SDHIs) and Energy Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4045 <https://doi.org/10.3390/ijms24044045>

SDHI aurait été plus appropriée, indiquant directement qu'en cas de dépassement de l'effet compensatoire la mort cellulaire peut survenir.

Concernant le chapitre 6 relatif aux VTR, le CES VSR valide l'ensemble des valeurs retenues ou construites par le GT SDHI. Néanmoins, il ne valide pas certaines parties du texte de ce chapitre.

1) Concernant les « points d'attention ⁶ » :

- De manière globale, le CES VSR ne valide pas les points d'attention tels qu'ils ont été inclus dans ce chapitre. En effet, ce chapitre 6 **se focalise sur le choix ou la construction de VTR**. Aussi :
 - soit les données disponibles sont suffisantes pour remettre en cause le choix de l'effet critique, l'étude clé, la dose critique (gamme de dose inadaptée, ...), et dans ce cas, cette mention est à intégrer dans l'analyse critique de la VTR et à prendre en compte par exemple *via* un facteur d'incertitude ;
 - soit les données scientifiques ne fournissent pas d'indication suffisante pour une telle remise en cause des VTR et ces « points d'attention » n'ont pas leur place dans ce chapitre.
- En outre, la plupart des « points d'attention » se fondent sur des observations isolées ou sporadiques, sans excès de risque ou relation dose-réponse statistiquement significatifs, et sans élément en faveur de leur reproductibilité. Selon les critères internationalement utilisés, ces observations ne peuvent donc pas être qualifiées d'« effet » de l'exposition à la substance testée (OMS, 2004⁷). Si des éléments mécanistiques sont considérés comme suffisants pour être constitutifs d'un faisceau d'arguments justifiant des recommandations spécifiques d'études complémentaires, c'est au chapitre 8 qu'ils devraient être discutés.
- Enfin, certains « points d'attention » ont trait à des effets (conformes aux critères évoqués ci-dessus) dont les données disponibles prouvent qu'ils surviennent à des doses supérieures aux VTR choisies ou élaborées par le GT. Aucun argument scientifique robuste n'étant apporté pour appuyer la possibilité que ces effets puissent survenir à des doses moindres, il s'agit alors d'un constat habituel lors de tout établissement de VTR⁸ qui ne justifie pas un « point d'attention » spécifique.

2) Concernant le boscalid, bien que la valeur ait été validée, le CES VSR estime l'argumentaire sur l'AOEL superflu (cf. chapitre 6.3.2.1.2), et indique que sa rédaction pourrait être de nature à semer le doute sur le corpus de données, sans que les données expérimentales disponibles ne le justifient. Le GT ne remet d'ailleurs pas en cause la VTR existante et ne propose pas l'ajout de facteurs d'incertitude supplémentaires, notamment en lien avec le corpus de données.

3) Le CES VSR admet que l'usage des contrôles historiques varie d'une étude à l'autre, et valide d'ailleurs la DJA de la carboxine et l'ARfD du pydiflumetofen (situations où les contrôles historiques conduisent à identifier une NOAEL plutôt qu'une LOAEL). Cependant, le CES VSR note l'absence d'homogénéité dans la manière dont le GT SDHI exploite les contrôles historiques : remise en question lorsque ces contrôles contribuent à ne pas retenir une observation comme un effet (boscalid, isopyrazam), argument d'appui au contraire

⁶ Les points d'attention sont définis par le GT comme des points n'impactant pas les VTR mais permettant l'identification de préoccupations, pouvant être en lien avec les effets critiques ou la qualité des données disponibles.

⁷ OMS -IPCS 2004 : IPCS Risk Assessment Terminology. Part 1:IPCS/OECD Key Generic Terms used in Chemical Hazard/Risk Assessment. Part 2:IPCS Glossary of Key Exposure Assessment Terminology

⁸ Les VTR sont, en effet, élaborées en prenant en compte les effets néfastes qui surviennent aux doses les plus faibles

lorsqu'une observation apparaît plus fréquente que dans les contrôles historiques (carboxine (effet cancérogène), penflufen, penthiopyrad).

Concernant le chapitre 7, le CES VSR souligne le travail considérable et l'abondance de données descriptives relatives aux pathologies mitochondriales qu'il comporte.

Sur le plan scientifique le CES VSR considère que :

- le rapport du GT avance l'hypothèse que tous les effets rapportés des SDHI sont explicables par leur effet inhibiteur de la SDH sans en apporter la preuve scientifique ;
- la prise en compte de l'intensité et de la durée d'inhibition des SDH induites par les SDHI, objet du rapport, est insuffisante. En effet, si les effets d'une déficience permanente ou de longue durée, d'origine génétique ou induite par certains SDHI non pesticides, sont clairement exposés dans le rapport, celui-ci n'apporte pas de preuve que l'inhibition partielle et transitoire de la SDH, telle qu'elle est raisonnablement prévisible du fait de l'utilisation des pesticides dont le principe actif est un SDHI, puisse être à l'origine des mêmes effets ;
- certains rapprochements, concluant par exemple à un mécanisme commun entre certaines affections, de mécanisme physiopathologique incertain, et certains agents chimiques utilisés expérimentalement sont insuffisamment étayés. Tel est par exemple le cas pour la chorée de Huntington et l'exposition au 3-NP.

Ainsi, le CES VSR regrette que ce chapitre ne soit pas simplement conclu par une synthèse listant les questions auxquelles les experts du GT attendaient des réponses de la littérature concernant l'impact sanitaire d'une inhibition partielle et transitoire de la SDH. Il ne valide donc pas ce chapitre.

Concernant le chapitre 8, le principe de lire de manière transverse les données issues de la littérature pour identifier d'éventuels effets communs des SDHI sur certains organes, sans être totalement innovant, est original. Le CES VSR, ouvert à toute évolution méthodologique susceptible de simplifier l'étude de familles chimiques et/ou des mélanges, l'a donc lu avec attention.

Le CES VSR estime néanmoins que l'exercice n'apporte finalement pas la contribution qu'il pouvait en attendre, pour deux raisons principales :

- en premier lieu, plusieurs sous-chapitres prennent en compte comme « effets » des observations isolées, non statistiquement significatives, sans relation dose-réponse (le paragraphe relatif aux effets oculaires en est une bonne illustration). Si le CES VSR admet qu'il puisse exister des relations dose-réponse non monotones, le caractère statistiquement significatif des variations de la réponse demeure indispensable pour les qualifier d'« effet », *a fortiori* s'il n'existe pas de reproductibilité expérimentale dans la littérature disponible. Le CES VSR conteste donc que de telles observations puissent être considérées comme un effet, ce qui réduit l'intérêt d'un certain nombre de paragraphes de ce chapitre ;
- s'agissant d'un rapport visant à définir des VTR, le CES VSR attendait de ce chapitre qu'il fournisse un argumentaire scientifique, étayé par des données bibliographiques, permettant :
 - o soit de penser que certains effets susceptibles d'être induits par les SDHI n'ont pas été (ou insuffisamment) étudiés dans les études disponibles,
 - o soit de penser que certains effets déjà observés dans les études disponibles sont susceptibles de survenir à des doses inférieures à celles testées dans ces études.

Dans les deux cas, ce chapitre aurait alors permis d'émettre des recommandations d'études complémentaires visant à explorer ces hypothèses et à servir de nouvelle référence, le cas échéant, pour l'élaboration de VTR (nouvelle étude clé, nouvel effet critique et/ou nouvelle dose critique). Cette finalité, à laquelle les cadres de synthèse rédigés à l'issue de certains sous-chapitres se prêtent parfaitement, semble avoir été perdue de vue dans le descriptif de plusieurs organes cibles potentiels des SDHI. Le chapitre 8 tel qu'il est rédigé cherche à démontrer que les SDHI sont nocifs pour tous ces organes (alors même que certains des « effets » identifiés par le GT n'en sont pas au plan statistique), sans finalement fournir d'argument convaincant pour remettre en cause les effets critiques pris en compte pour l'élaboration des VTR, ou les doses critiques utilisées pour les élaborer. Interpréter une « somme » d'observations non statistiquement significatives à la lueur d'une hypothèse non vérifiée sur la base de la littérature disponible ne contribue pas à la construction des VTR, principal objet de ce rapport. Le CES VSR ne valide donc pas ce chapitre. Il rappelle que la méthode de construction d'une VTR se fonde sur l'identification d'un effet critique (celui des effets dont l'incidence est significativement augmentée par l'exposition, qui survient à la dose la plus faible). En conséquence, la VTR étant fixée sur l'effet apparaissant à la plus faible dose, elle protège de l'ensemble des effets qui sont donc bien tous pris en compte.

La lecture successive des chapitres 7 et 8 semble globalement poser comme *primum movens* de l'affirmation d'un effet sa plausibilité biologique, en rendant accessoire sa confirmation expérimentale, clinique ou épidémiologique. Si l'existence d'un possible mécanisme d'action peut suffire à émettre des hypothèses et à déclencher des études expérimentales pour le confirmer, voire pour identifier, des effets sanitaires en découlant, l'élaboration d'une VTR s'appuie, quant à elle, avant tout sur l'existence d'un effet et d'une dose critiques basés sur l'augmentation statistiquement significative de la survenue de cet effet. L'existence d'un mécanisme d'action susceptible d'expliquer l'effet dont l'incidence est significativement augmentée est un argument en faveur du caractère causal de l'association entre l'exposition et l'effet. Au regard du niveau de preuves exigé pour construire une VTR, celle-ci ne peut être élaborée sur la base d'un « effet néfaste théoriquement plausible » selon la formulation proposée à la page 178 du rapport.

Le CES VSR regrette ainsi que le travail considérable produit par le GT n'ait pas été essentiellement consacré à l'analyse critique des VTR actuelles, pour leur révision ou leur établissement, mesures propres à garantir la sécurité des populations exposées. Le chapitre 7 prouve l'importance du système mitochondrial en général et du complexe SDH en particulier, et de la gravité de ses atteintes pérennes. Cependant, le CES VSR en attendait qu'il permette de dresser une liste de questionnements susceptibles de se poser quant à l'action et surtout aux effets sanitaires éventuels des pesticides SDHI. Ceci aurait permis d'identifier les points auxquels le corpus de données n'apporte pas de réponse et d'étayer des recommandations d'études complémentaires ciblées. A défaut d'être rédigé dans cette optique, ce chapitre semble suggérer que dans la mesure où les mitochondries sont ubiquitaires, toute observation (statistiquement significative ou non) peut être imputée à l'inhibition de la SDH.

Concernant les recommandations émanant du GT, le CES VSR ne soutient pas un certain nombre des recommandations de recherche émises. En effet, même si le CES VSR est *a priori* favorable à la conduite d'études permettant de mieux identifier les effets, comprendre les mécanismes d'action ou mesurer les impacts d'une exposition aux SDHI, certaines recommandations émises par le GT :

- ne semblent pas suffisamment argumentées ou justifiées par les données disponibles,

- ne semblent pas de nature à justifier la remise en cause ou l'élaboration de nouvelles VTR.

Plus précisément :

- la recommandation 4 « favoriser le développement des AOP » propose l'élaboration d'AOP. Bien qu'une structuration des données mécanistiques disponibles soit évidemment intéressante, dès lors qu'un effet délétère (*adverse outcome*) est confirmé expérimentalement, voire au niveau épidémiologique, les données disponibles à ce stade ne permettent pas de penser que cela pourrait remettre en cause les VTR existantes ;
- concernant la recommandation 5 « évaluer les effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité », sa mise en œuvre n'étant pas de nature à remettre en cause ou à améliorer les VTR existantes qui ont trait aux effets d'une exposition humaine, le CES VSR ne la valide pas car elle sort du périmètre de son expertise.

Concernant les « **contributions personnelles** », le CES VSR note leur caractère inhabituel. Elles ne sont pas le fruit d'un travail et d'une validation collectifs. Le CES VSR estime que ces contributions sont assimilables à des auditions et ne sont donc pas constitutives du rapport d'expertise collective. Dans cette logique, le CES VSR n'émet aucun avis sur ces « contributions » qui n'engagent que leur(s) auteur(s).

Le CES VSR tient à rappeler que sa mission consiste à choisir ou élaborer des VTR avec la collaboration des GT qui lui sont rattachés, et non à émettre un avis sur la pertinence d'utiliser ou de mettre sur le marché une substance. L'élaboration de valeurs de référence ne peut s'appuyer que sur des données scientifiques solides, des effets sanitaires avérés dont le lien de causalité avec l'exposition à la substance étudiée est étayé par un niveau de preuves suffisant. C'est au regard de cet objectif, conformément à sa méthodologie scientifique et sur la base des données disponibles à ce jour, que le CES VSR rend cet avis. Les VTR des SDHI, comme toutes les VTR, devront être réévaluées si des données expérimentales ou épidémiologiques nouvelles mettent en évidence un ou des effets sanitaires nouveaux (selon les critères rappelés plusieurs fois dans cet avis) et/ou survenant à des doses d'exposition plus faibles que celles utilisées pour l'élaboration des VTR actuelles.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

À la suite d'une alerte d'un collectif de scientifiques concernant les risques pour la santé humaine que pourrait présenter l'utilisation de fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), l'Anses s'est autosaisie le 24 mai 2018 afin de déterminer si les informations et hypothèses mentionnées par ces scientifiques apportaient, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives fongicides concernées. Le 14 janvier 2019, l'Anses publiait un avis qui concluait que les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte n'apportaient pas d'élément en faveur de l'existence d'une alerte sanitaire motivant un retrait des autorisations de mise sur le marché de ces fongicides. Cependant, l'Anses lançait un appel à la vigilance aux niveaux européen et international, et soulignait la nécessité de renforcer la recherche sur de potentiels effets toxiques chez l'humain.

Parmi les actions menées dans le cadre du traitement de ce signalement, l'Agence a contacté des instances européennes et internationales (EFSA, ECHA, Commission européenne, US EPA, ARLA⁹) afin, notamment, de les informer et de savoir si elles avaient connaissance de préoccupations similaires concernant les SDHI. Elle a ensuite sollicité l'analyse de l'Inserm dans le cadre de la finalisation par cet institut de son expertise collective Pesticides et Santé pour que la question des liens entre exposition et effets sanitaires des SDHI soit bien actualisée au vu des dernières données disponibles. Enfin, et compte tenu du constat de l'absence de données épidémiologiques pertinentes, l'Anses a lancé – dans le cadre de sa mission de phytopharmacovigilance – une étude de faisabilité préfigurant une recherche épidémiologique spécifique.

Dans le cadre de la poursuite du traitement de ce signalement, l'Anses s'est autosaisie dans deux voies complémentaires, issues notamment des recommandations formulées au cours de la première expertise. L'une des saisines concerne une évaluation des expositions cumulées aux substances actives de la famille des SDHI, faisant l'objet d'un avis complémentaire au présent avis.

De plus, en date du 6 décembre 2019, l'Anses s'est autosaisie pour actualiser les données de la littérature scientifique publiées depuis l'approbation des substances actives de la famille des SDHI afin d'identifier si des éléments nouveaux pouvaient, d'une part, nécessiter une mise à jour de l'avis et du rapport du groupe d'expertise collective de janvier 2019 et, d'autre part, justifier une modification des évaluations menées dans le contexte réglementaire européen sur les substances de la famille des SDHI. C'est l'objet du présent avis, complémentaire de celui précité sur les expositions cumulées publié par ailleurs.

Dans le cadre de cette autosaisine, les questions posées étaient les suivantes :

- *l'analyse des éléments disponibles ou à venir¹⁰, notamment les effets critiques, la pharmacocinétique doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence*

⁹ Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada

¹⁰ Expertise collective de l'Inserm en particulier.

toxicologiques des substances ? A cet égard, une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI ;

- *l'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances ?*
- *au regard de ces éléments, si des modifications des valeurs toxicologiques de référence (VTR) des substances SDHI sont considérées nécessaires, des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen.*

L'Anses attendait plus particulièrement de cette expertise une approche transversale prenant en compte l'ensemble des SA SDHI, basée sur l'analyse des éléments disponibles dans la littérature et dans les dossiers réglementaires afin que le GT puisse formuler des propositions concernant les valeurs toxicologiques de référence.

En effet, une valeur toxicologique (ou valeur sanitaire) de référence (VTR) est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier, à la lumière des connaissances disponibles, un risque pour la santé humaine, pour une voie d'exposition donnée et une temporalité donnée (court, moyen ou long terme). En ce sens, une VTR constitue la traduction de l'état des connaissances scientifiques pour assurer la protection des personnes exposées à un danger. L'effet critique désigne alors l'effet intervenant aux niveaux d'exposition les plus faibles, qui est suffisamment documenté sur un plan scientifique. Aussi, l'enjeu majeur par rapport aux questionnements du signalement SDHI n'est pas seulement de savoir si un mécanisme de toxicité mitochondriale débouche sur un effet délétère, mais surtout d'identifier si cette toxicité se manifeste à un niveau d'exposition plus faible que celui qui est délimité par la VTR.

Afin de répondre à ces attentes, l'Anses a constitué, après appel à candidature ouvert, un groupe de travail SDHI (GT SDHI), rattaché, compte tenu de la couverture des travaux de cette expertise, à deux Comités d'experts spécialisés : le CES « produits phytopharmaceutiques et produits de biocontrôle » (CES Phyto BC) et le CES « valeurs sanitaires de référence » (CES VSR).

L'ampleur des travaux, le temps nécessaire d'appropriation de la problématique par les experts du GT, et la volonté de ceux-ci d'exploiter au mieux le contenu des dossiers réglementaires d'une part, et la littérature scientifique d'autre part, a conduit le GT, qui a entrepris une revue de l'ensemble des VTR de 14 substances SDHI, soit un total de 39 VTR, à solliciter à plusieurs reprises des reports de l'échéance que l'Anses avait fixée dans son mandat. L'Anses a néanmoins fixé une échéance finale à mi-2023 pour les travaux des différents collectifs en vue de conclure, soit 2 ans et demi après le début des travaux du GT.

Que ce soit au sein du GT lui-même, ou entre le GT et les CES de rattachement, l'Agence note qu'il n'y a pas eu systématiquement convergence sur les conclusions scientifiques, quand bien même un temps significatif a été consacré aux débats. Comme prévu dans les principes fondamentaux de l'expertise collective à l'Anses, l'Agence assure la transparence sur les points de non convergence. Elle est matérialisée, pour ce qui concerne les divergences au sein du GT, par l'insertion en annexe du rapport ou de l'avis des positions divergentes. Les écarts de convergence entre le GT et les deux CES sont quant à eux restitués dans la formulation des différentes parties de la partie 3 du présent avis, où l'Agence note que certaines parties du rapport n'ont pas été endossées par l'un ou l'autre des CES. En effet, le

rapport du GT a été examiné par les deux comités d'experts spécialisés (CES) de l'Agence cités ci-dessus.

Le CES VSR a validé l'ensemble des VTR proposées par le GT SDHI. Néanmoins, il n'a pas validé les parties de ce chapitre concernant les points d'attention soulevés par le GT à propos de ces substances. De même, il n'a pas validé les chapitres 7 (Dysfonctionnement de la SDH, pathologies et organes cibles) et 8 (Toxicité par organes). De plus, concernant les recommandations émanant du GT, le CES VSR n'a pas soutenu un certain nombre des recommandations de recherche émises.

Le rapport du GT SDHI a été validé par le CES « substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle ». Toutefois, concernant le chapitre 7, une majorité des experts s'est abstenue.

Par ailleurs, le rapport du GT comporte des « contributions personnelles » qui contiennent des informations additionnelles en lien avec les questions de la saisine et qui figurent, pour des raisons de transparence, à la suite des annexes du rapport. Elles ont été mises à disposition des CES pour information bien qu'elles n'aient pas fait l'objet pour des raisons calendaires d'une validation par l'ensemble du GT. De même, elles n'ont pas fait l'objet d'une validation par les CES.

Aussi, la position de l'Anses est celle exprimée ci-dessous.

Conclusions de l'Anses

Le GT s'est intéressé à 14 SA de la famille des SDHI (13 fongicides et 1 acaricide). Il s'agit des substances ayant fait l'objet d'une évaluation européenne disponible au moment des travaux du GT. Le GT a conduit une nouvelle analyse de la toxicité de ces substances et produit des recommandations pour faire évoluer certaines des VTR utilisées.

Concernant les VTR, l'Agence rappelle que pour les substances phytopharmaceutiques, trois VTR principales, telles que définies dans la partie 3.1.1 de cet avis, sont utilisées :

- l'AOEL (Acceptable Operator Exposure Level, ou niveau acceptable d'exposition de l'opérateur) ;
- la DJA (dose journalière admissible) ;
- l'ARfD (acute reference dose ou dose de référence aiguë).

Dans le cadre de son expertise, le GT a notamment analysé les éléments qui ont conduit à la fixation des VTR existantes en se focalisant sur :

- la qualité des études clés,
- l'analyse de la pertinence des effets critiques retenus,
- le choix de la dose critique.

De plus, il a qualifié les VTR confirmées ou faisant l'objet de propositions alternatives à l'aide d'un niveau de confiance, en appliquant le guide méthodologique de l'Anses (Anses, 2017).

Le GT a considéré que 11 VTR sur les 39 analysées nécessiteraient d'être révisées. Ces propositions s'appuient sur une nouvelle analyse des données disponibles dans les dossiers

soumis dans le cadre de l'approbation des substances actives au titre du règlement (CE) n°1107/2009 et dans la littérature. Les évolutions sont basées sur les motifs suivants : un choix différent de l'étude clé ou de la dose critique (par exemple, une NOAEL¹¹ établie dans le dossier considérée comme une LOAEL¹² selon le GT) mais aussi sur un choix différent de l'effet critique ou des incertitudes liées à la qualité de l'étude clé.

Les recommandations du GT portent sur les VTR et les substances actives suivantes :

- AOEL pour le benzovindiflupyr, le cyflumetofen et l'isofetamid

Substance	AOEL (mg/kg pc/j) harmonisée au niveau UE	AOEL (mg/kg pc/j) proposition du GT	Motivation
Benzovindiflupyr	0,04	0,012	Diminution de la NOAEL
Cyflumetofen	0,11	0,07	Changement de l'étude clé
Isofétamid	0,05	0,03	Changement de l'étude clé

- DJA pour la carboxine, le cyflumetofen, le fluopyram, l'isopyrazam et le penthiopyrad

Substance	DJA (mg/kg pc/j) harmonisée au niveau UE	DJA (mg/kg pc/j) proposition du GT	Motivation
Carboxine	0,008	0,0027	La NOAEL est considérée comme une LOAEL - ajout d'un facteur de sécurité de 3
Cyflumetofen	0,17	0,1	Changement de l'étude clé
Fluopyram	0,012	0,004	Ajout d'un facteur de sécurité de 3 (incertitude sur les données)
Isopyrazam	0,03	0,018	Facteur de sécurité de 3 au lieu de 2 (LOAEL – NOAEL)
Penthiopyrad	0,1	0,03	Changement de l'étude clé. Utilisation d'une LOAEL (ajout d'un facteur de sécurité de 3)

- ARfD pour le cyflumetofen, le penflufen et le pydiflumetofen

Substance	ARfD (mg/kg pc) harmonisée au niveau UE	ARfD (mg/kg pc) proposition du GT	Motivation
Cyflumetofen	-	0,5	Changement de l'étude clé
Penflufen	0,5	0,33	La NOAEL est considérée comme une LOAEL - ajout d'un facteur de sécurité de 3
Pydiflumetofen	0,3	0,1	Changement de l'étude clé

¹¹ NOAEL — Dose la plus élevée à laquelle aucun effet toxique ou indésirable n'a été observé.

¹² LOAEL — Dose la plus faible à laquelle un effet toxique ou indésirable a été observé.

L'Anses endosse ces propositions du GT. L'Agence note que ces modifications conduisent à diminuer ces VTR au minimum d'un facteur 1,5 et au maximum d'un facteur 3,3.

A la lumière de ces propositions, l'Agence retient les actions suivantes :

- **Le benzovindiflupyr** (AOEL¹³) est en cours d'instruction dans le cadre de la procédure de renouvellement d'approbation. La France est l'Etat membre rapporteur, l'Autriche l'Etat membre co-rapporteur. La proposition concernant l'AOEL sera présentée dans le cadre du projet de rapport d'évaluation qui sera transmis à l'EFSA en 2024 puis soumis à consultation publique préalablement à la phase de revue par les pairs et publication des conclusions de l'évaluation par l'EFSA.
- **Le cyflumetofen** (AOEL, DJA, ARfD), **le fluopyram** (DJA), **l'isofetamid** (AOEL) et **le penthiopyrad** (DJA) sont en cours d'instruction dans le cadre de la procédure de renouvellement d'approbation. Les transmissions des projets de rapports d'évaluation à l'EFSA sont attendues entre 2023 et 2025. Les propositions de modification des VTR seront transmises dans le cadre de la consultation publique sur les projets de rapports d'évaluation.
- **Le pydiflumetofen** (ARfD) est en cours d'instruction dans le cadre de la procédure d'approbation. La France est l'Etat membre rapporteur et l'Autriche l'Etat membre co-rapporteur. Dans le projet de rapport initial soumis à consultation publique, la proposition d'ARfD était fixée à 0,1 mg/kg pc. Faisant suite à la consultation publique et à la phase de revue par les pairs cette valeur a été fixée à 0,3 mg/kg pc. Cette valeur a été retenue dans les conclusions de l'EFSA¹⁴. Il est proposé de conserver la valeur de 0,3 mg/kg pc issue d'une évaluation européenne récente.
- Pour la carboxine (DJA) et l'isopyrazam (DJA), aucune action n'est jugée nécessaire car les substances ne sont plus approuvées au titre du règlement (CE) n°1107/2009.
- Pour le penflufen (ARfD), aucune action n'est jugée prioritaire car l'échéance de l'approbation de la substance au titre du règlement (CE) n°1107/2009 est déjà fixée au 31/05/2025.

Concernant les données épidémiologiques, dans le cadre de l'expertise de l'Inserm (2021), il avait été constaté qu'il n'existait à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets des substances actives SDHI sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La recherche bibliographique réalisée par les experts n'a pas permis d'identifier des données supplémentaires.

Au-delà des conclusions et actions mentionnées ci-dessus relatives aux VTR, l'Anses tire les constats suivants de l'analyse des experts sur les données toxicologiques et mécanistiques.

S'agissant des « points d'attention » soulignés par le GT dans ses conclusions et recommandations à propos des VTR, l'Agence considère – à l'instar du CES VSR – que s'ils peuvent présenter une utilité pour guider les réflexions méthodologiques ou les investigations

¹³ Dans la parenthèse est rappelé la nature de la VTR revue et sur laquelle portera l'action d'information des acteurs européens.

¹⁴ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5821>

futures sur le mode d'action des substances SDHI en général, ils ne constituent pas des remises en cause des VTR.

De plus, l'Anses souligne que cette analyse ne permet pas de distinguer les conséquences sanitaires liées à une inactivation permanente, telle que peuvent en générer des déficiences génétiques, de celles d'une inhibition – qui peut être d'ampleur modulée et temporaire – de la SDH par des xénobiotiques tels que les SDHI utilisés comme PPP.

Recommandations méthodologiques et de recherche de l'Anses

L'Anses endosse les recommandations méthodologiques et de recherche suivantes :

- **Poursuivre l'amélioration des connaissances concernant le mécanisme d'action des SDHI et ses conséquences sanitaires :**
 - en développant une stratégie séquentielle pour évaluer le potentiel mitotoxique et ses conséquences fonctionnelles ;
 - en améliorant les connaissances sur la pharmacocinétique en vue de faciliter l'exploitation de données toxicologiques *in vitro*,
 - en favorisant le développement des AOP (« adverse outcome pathway »). En effet, les AOP permettent d'identifier une chaîne séquentielle d'événements liés par un lien de causalité à différents niveaux de l'organisation biologique qui conduisent à un effet néfaste sur la santé ou à un effet écotoxicologique.

Ces sujets pourront être portés auprès de l'OCDE et de l'EFSA afin de définir des stratégies de tests et des protocoles d'études, incluant des critères d'interprétation des résultats, qui pourront être utilisées dans le cadre de l'évaluation.

- **Améliorer les connaissances sur les niveaux d'exposition des populations aux SDHI.** L'Anses a d'ores et déjà intégré, dans l'enquête d'alimentation totale (EAT) n°3 (en cours de déploiement), l'identification de 4 SA SDHI. S'agissant des études de surveillance à venir, elle explorera les possibilités de l'intégration des SA SDHI dans les études qu'elle pilote et se rapprochera des partenaires porteurs de ce type d'études.

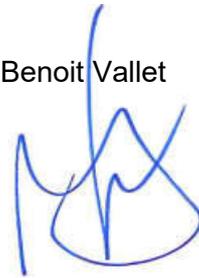
Par ailleurs, l'Agence renvoie à son autre avis, relatif à l'exposition cumulée des consommateurs français aux substances SDHI (autosaisine 2019-SA-0135). Cette évaluation rétrospective des risques cumulés a été réalisée en s'appuyant sur deux méthodes distinctes d'évaluation du risque cumulé, l'une déterministe, l'autre probabiliste. **Elle a conclu qu'il n'est pas attendu de risque inacceptable pour les consommateurs français, au sens du règlement (CE) n°546/2011, liés à l'exposition chronique aux substances actives de la famille des SDHI, y compris en utilisant les VTR proposées par le GT.**

De plus, en ce qui concerne les sous-populations à risque, l'Anses poursuit, après avoir financé l'étude de faisabilité, le déploiement d'une étude concernant l'impact des expositions

environnementales sur le risque tumoral chez les sujets à risque de paragangliome héréditaire SDH-déterminé (étude PGL Expo) à l'aide de données épidémiologiques.

- **Améliorer la connaissance des effets potentiels des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité.** A ce titre, il est à noter que les substances de la famille des SDHI pourront être abordées dans le futur projet européen sur l'évaluation des risques environnementaux piloté par l'EFSA (PERA - Advancing the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products towards a system-based approach).

Pr Benoit Vallet



MOTS-CLÉS

Inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI), substances phytopharmaceutiques, mitochondrie, santé humaine, valeurs toxicologiques de référence

Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI), phytopharmaceuticals, mitochondria, human health, reference toxicological values

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Actualisation des données relatives aux substances phytopharmaceutiques de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI). (saisine 2019-SA-0202). Maisons-Alfort : Anses, 53 p.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Claude EMOND – Professeur associé à l'université de Montréal - Evaluation du risque, environnementale et professionnel, nanoparticules, interaction mélange, PBPK, pharmacocinétique

Membres

M. Thierry BARON – Chef d'unité « Maladies neuro-dégénératives » à l'Anses - Neurotoxicité, maladies neuro-dégénératives, prions, modèles expérimentaux animaux

Mme Sylvie BORTOLI – Ingénieure de Recherche à l'Université Paris Cité - toxicologie mécanistique, reprogrammation métabolique, cancer, dysfonctionnement mitochondrial, métabolisme énergétique et pathologies

M. Frédéric BOUILLAUD – Directeur de recherche à l'INSERM – Mitochondries, bioénergétique (jusqu'au 01/11/2022)

M. Thomas CLAUDEPIERRE – Professeur des universités - Neurosciences, pathologie neurodégénératives, cultures neuronales primaires, phénotypage comportemental, rétine, neuroprotection

Mme Fatima DJOUADI – Directrice de Recherche à l'INSERM - Métabolisme oxydatif mitochondrial, oxydation des acides gras, chaîne respiratoire, régulation mitochondriale (jusqu'au 31/12/2022)

M. Jérôme HENRI – Chargé de projets de recherche à l'Anses – ADME, toxicologie vitro, PBPK, expérimentation animale

Mme Laurence HUC – Directrice de recherche à l'INRAE - Cancérogenèse environnementale, toxicologie alimentaire, mitotoxicité, stress oxydant, métabolisme énergétique, mécanismes cellulaires de toxicité

M. Anthony LEMARIE – Maître de conférence, Biochimie Clinique et Métabolique à l'Université de Toulouse - Métabolisme mitochondrial, tumeurs cérébrales, cellules souches cancéreuses, radiobiologie, mécanismes de résistance, cancérogenèse, succinate déshydrogénase

Mme Béatrice MORIO-LIONDORE – Directrice de recherche à l'INRAE - Mitochondrie, Mitochondria-ER associated membranes (MAMs), maladies métaboliques chroniques non transmissibles, physiologie, vieillissement, recherche translationnelle (jusqu'au 20/12/2022)

M. Jean-Ulrich MULLOT – Pharmacien en chef, Chef du laboratoire LASEM Laboratoire d'analyses de surveillance et d'expertise de la Marine - Toxicologie réglementaire, réglementation des produits chimiques, évaluation quantitative des risques sanitaires

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche à l'INSERM – Epidémiologie, pesticides, perturbateurs Endocriniens, reproduction, fertilité, cancers hormono-dépendants

M. Rodrigue ROSSIGNOL – Directeur de recherche à l'INSERM - Mitochondries, Bioénergétique, Maladies Rares, Cancer, Thérapie mitochondriale, Toxicité Mitochondriale

M. Bernard SALLES – Professeur émérite de l'Université de Toulouse - Toxicologie, cancérogénèse, nanotoxicologie, modèles vitro/vivo

M. Ludovic WROBEL – Biologiste de Recherche - oncologie, neurobiologie, neurotoxicité, immunotoxicité, respiration cellulaire

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

- CES Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle

Président

M. Jean-Ulrich MULLOT – Pharmacien militaire (Service de santé des Armées). Spécialité : Toxicologie, Evaluation des risques, Réglementation, Radionucléides, Chimie Analytique

Vice-président

M. Christian GAUVRIT – Retraité de l'Institut national de la recherche agronomique - INRA. Spécialité : Efficacité, Herbicides, physiologie végétale, adjuvants, formulants

Membres

M. Marc BARDIN – Directeur de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Efficacité, Biocontrôle, phytopathologie, microbiologie

M. Enrique BARRIUSO – Directeur de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Environnement, devenir, transferts, sols, chimie

M. Philippe BERNY – Enseignant – Chercheur (Vetagro Sup). Spécialité : Ecotoxicologie, oiseaux et mammifères

Mme Marie-France CORIO-COSTET – Directrice de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Efficacité, fongicides, herbicides, vigne, résistance, stimulateurs des Défenses des Plantes, Biocontrôle,

M. Jean-Pierre CUGIER – Retraité du Ministère de l'agriculture, Senior Scientific Officer (Autorité européenne de sécurité des aliments) jusqu'au 30/09/2016. Spécialité : Résidus et sécurité consommateur

M. Marc GALLIEN – Chargé de mission (MSA). Spécialité : Application des produits phytopharmaceutiques, Exposition des opérateurs et des travailleurs, Analyse des conséquences sur la santé humaine des expositions aux produits phytopharmaceutiques

Mme Sonia GRIMBUHLER – Chercheuse (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Evaluation de l'exposition des agriculteurs - Machinisme agricole - Mesurage de terrain

Mme Guillermina HERNANDEZ RAQUET – Directrice de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE) . Spécialité : Microbiologie, écologie microbienne, biodégradation, chimie analytiques, polluants persistants, écotoxicologie, biotechnologie

M. François LAURENT – Chargé de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Métabolisme, résidus composés organiques, Contamination de l'environnement, Physiologie Végétale

Mme Laure MAMY – Directrice de recherche (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement - INRAE). Spécialité : Devenir des pesticides dans environnement – Modélisation

M. Patrick SAINDRÉAN Patrick – Retraité du Centre national de la recherche scientifique – CNRS. Spécialités : Phytopathologie, Fongicides, Stimulateurs des Défenses des Plantes, Modes d'action, Biocontrôle, Métabolisme de résidus de pesticides dans les végétaux

Mme Jeanne STADLER – Consultante en Toxicologie, Retraîtée du Centre de recherche Pfizer. Spécialité : Toxicologie de la reproduction

■ CES Valeurs sanitaires de référence

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue au Service de prévention et santé au travail de Corrèze et de Dordogne (SPST 19-24) – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Vice-président

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle – Démission en mars 2023

Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Physiologie animale, électrophysiologie, biologie cellulaire, cardiotoxicité – A partir de mai 2023

Membres

M. Luc BELZUNCES – Directeur de Recherche et Directeur du Laboratoire de Toxicologie Environnementale à l'INRAE – Compétences : Toxicologie générale, Neurotoxicologie, Écotoxicologie, chimie analytique, évaluation des risques

Mme Michèle BISSON – Toxicologue Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : Pharmacien toxicologue, VTR, évaluation des risques sanitaires

Mme Céline BOTINEAU - Ingénieur de prévention du risque chimique au CEA – Compétences : Hygiène industrielle, chimie, évaluation des risques – Démission novembre 2022

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire - Compétences : épidémiologie

M. François CLINARD - Épidémiologiste à l'Agence Santé Publique France – Compétences : Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires – Démission en mai 2023

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Programme des Monographies. Evidence Synthesis and Classification Branch. Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

M. Claude EMOND – Professeur associé - École de santé publique, Université de Montréal - Département de santé environnementale et santé au travail. – Compétences : Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Paris - Compétences : Toxicologie médicale, santé au travail, santé environnementale

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC – Compétences : médecine du travail, toxicologie professionnelle et environnementale – Démission en février 2023

M. Kevin HOGEVEEN – Toxicologue, Anses – Fougères, Toxicologie des Contaminants – Compétences : Toxicologie, génotoxicité, hépatotoxicité, toxicologie *in vitro*

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

M. Frédéric LIRUSSI – Professeur des Universités– Praticien Hospitalier (PU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHRU de Besançon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité – Démission en mars 2023

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche, INSERM U1085 - IRSET – Compétences : Épidémiologie, Perturbateurs Endocriniens, Pathologies des fonctions et des organes de la reproduction

Mme Nadia NIKOLOVA-PAVAGEAU – Conseiller médical à l'INRS – Compétences : Médecine du travail, toxicologie médicale, IBE

M. Benoît OURY – Responsable d'études à l'INRS – Compétences : Métrologie atmosphérique, Air des lieux de travail, évaluation expositions professionnelles

M. Henri SCHROEDER – Maître de Conférence à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine –Département Neurosciences et Biologie Animale et unité INSERM U1256 Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques environnementaux - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : Neurotoxicité, polluants Environnementaux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

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

M. Jérôme THIREAU – PhD, Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Physiologie animale, électrophysiologie, biologie cellulaire, cardiotoxicité – membre du CES jusqu'en avril 2023 puis vice-président

Mme Maeva WENDREMAIRE – Maître de conférences à l'Université de Bourgogne – Compétences : Toxicologie, reprotoxicité, pharmacologie, toxicologie analytique

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Département de Néphrologie et Transplantation d'organes ; Centre de Référence des Maladies Rénales Rares ; CHU de Toulouse - INSERM U1297 (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) Université Toulouse III

M. Stanislas FAGUER – MD, PhD, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH)

ANNEXE 2

Lettre de saisine



2019-SA-0202

Décision N° 2019-12-333

AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

Décide :

Article 1^{er}.- L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

L'Anses lance une nouvelle auto-saisine visant à actualiser les données de la littérature scientifique publiées depuis l'approbation des substances fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) afin d'identifier si des éléments nouveaux pourraient, d'une part, nécessiter une actualisation de l'avis et du rapport du groupe d'expertise collective¹ et, d'autre part, justifier une modification des évaluations menées au niveau européen sur les substances de la famille des SDHI.

1.2 Contexte de l'autosaisine

Après l'alerte d'un collectif de scientifiques, l'Anses avait mandaté en mai 2018 un groupe d'expertise collective en urgence pour déterminer si « les informations et hypothèses scientifiques apportées par les auteurs [de la tribune ...] apportent ... des éléments en faveur d'expositions et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées ». L'avis de l'agence pris sur le fondement de cette expertise a été publié en janvier 2019¹.

Par ailleurs, l'Anses a informé et lancé un appel à la vigilance auprès des autorités européennes et nord-américaines et auprès des autres Etats Membres, et a saisi l'Inserm afin que la question des SDHI soit prise en compte dans le cadre de son expertise collective en cours relative à l'impact des pesticides.

¹ AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) ». 15 janvier 2019

ANSES/PR19/02-01 (version c) – code Error : ANSES/PCE/6639 1 / 2

De plus, L'Anses s'est autosaisie sur les risques cumulés pour les consommateurs en relation avec une exposition aux SDHI. Les résultats sont attendus en mars 2020.

L'Anses a également favorisé l'émergence et financé des projets de recherche et, via les dispositifs de surveillance coordonnés par la phytopharmacovigilance, cherche à détecter d'éventuels effets sanitaires des SDHI pouvant être observés sur le terrain.

Suite à cela, l'Anses a identifié différentes données ou études récemment publiées, parmi lesquelles la publication de Benit et al. dans Plos One, qui devront être analysées. Le rapport d'expertise collective de l'Inserm susmentionné devra également être pris en compte.

Pour répondre à l'auto-saisine, un groupe de travail (GT) ad hoc sera constitué à partir des viviers d'experts de l'agence (collectifs existants et viviers de personnes compétentes). Les conclusions de ce groupe seront validées par les CES référents.

1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Les questions suivantes seront examinées :

- L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances ? À cet égard, une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI ;

L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances ?
- Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? Dans l'affirmative, des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

Les conclusions finales devront être rendues dans un délai de 12 mois, un avis intermédiaire sur la nécessité d'une actualisation de l'avis du GECU de janvier 2019 est attendu dans un délai de 6 mois

Article 2.- Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

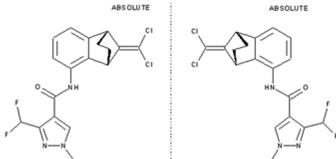
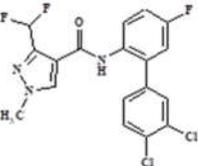
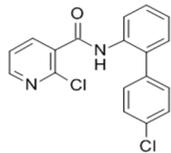
Fait à Maisons-Alfort, le 06 DEC. 2019



Dr Roger Genet
Directeur général

ANNEXE 3

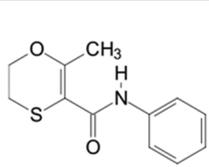
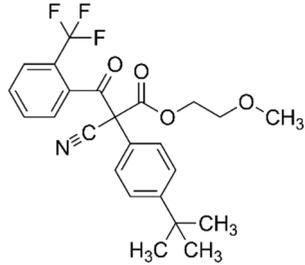
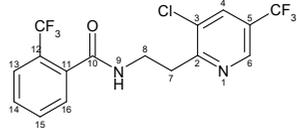
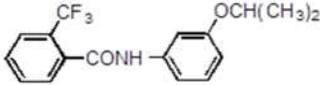
Tableau 1 : Identité et statut réglementaire dans l'UE des SDHI considérés dans l'expertise

Liste SDHI (source : FRAC et IRAC)	Numéro CAS	Famille chimique	Structure chimique	Principaux types d'usages en France (ephy, 24/04/2023)	Date de fin d'approbation de la SA ¹⁵	Classification harmonisée et opinions du RAC ¹⁶
Benzovindiflupyr	1072957-71-1	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, gazons (greens et tees de golfs)	Approuvée 02/03/2024	Acute tox 3 - H301 / H331 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP9; 2016)
Bixafen	581809-46-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, crucifères oléagineuses	Approuvée 31/05/2025	Pas de classement
Boscalid (ancien nom : nicobifen)	188425-85-6	Pyridine-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, vigne, arboriculture, crucifères oléagineuses, graines protéagineuses, légumineuses, soja, tournesol, lin, légumes, cultures porte-graines	Approuvée 15/04/2026	Pas de classement

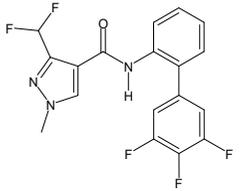
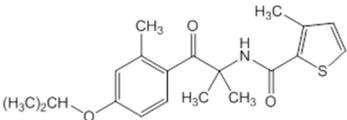
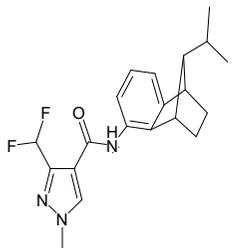
¹⁵ SA : substance active

¹⁶ les opinions du RAC ont été renseignées dans les cas où celles-ci n'ont pas encore été implémentées dans la réglementation CLP.

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

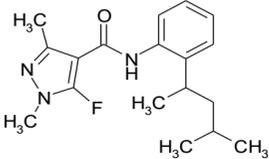
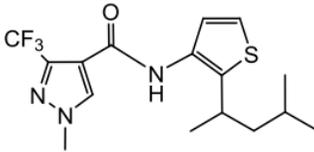
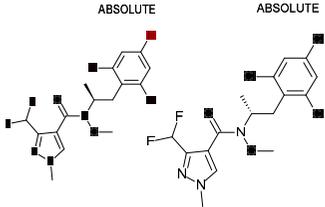
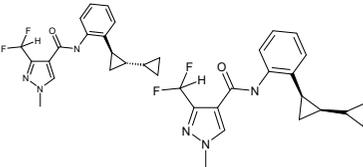
Carboxine	5234-68-4	Oxathiin carboxamide		Traitement de semences : céréales	Non approuvée 31/05/2021	Skin Sens. 1 - H317 STOT RE 2 - H373 (reins) Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP14; 2019)
Cyflumetofen	400882-07-7	benzoylacétoni trile		Acaricide Traitement des parties aériennes : cultures florales, plantes vertes et fraisiers (uniquement autorisé sous abri hors- sol)	Approuvée 31/10/2025	Carc. 2 – H351 Skin Sens. 1A – H317 (ATP14; 2019)
Fluopyram	658066-35-4	Pyridinyl-ethyl- benzamide		Traitement des parties aériennes : céréales, arboriculture, cultures légumières, oléagineux, bananes, gazons (golfs et terrains de sport) Traitement du sol : cultures légumières et ornementales (usage fongicide et nématicide)	Approuvée 31/01/2024	Aquatic chronic 2 - H411 (ATP9; 2016)
Flutolanil	66332-96-5	Phenyl benzamide		Traitement des tubercules/semences : pommes de terre	Approuvée 29/02/2024	Pas de classement

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Fluxapyroxad	907204-31-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement de semences et des parties aériennes : céréales, arboriculture, cultures légumières, cultures porte-graines Traitement du sol : pommes de terre	Approuvée 31/05/2025	Lact - H362 Aquatic acute 1 - H400 Aquatic chronic 1 - H410 (ATP15; 2020)
Isofétamid	875915-78-9	Phenyl-oxo-ethyl thiophene amide		Traitement des parties aériennes : vigne, arboriculture, fraisiers, fines herbes, laitue, crucifères oléagineuses	Approuvée 15/09/2026	Pas de classement
Isopyrazam	881685-58-1	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : plantes ornementales (date limite du retrait des AMM ¹⁷ des produits par les états membres : 08/09/2022)	Non approuvée 08/06/2022	Carc. 2 – H351 Repr. 1B – H360D Skin Sens. 1B – H317 Aquatic Acute 1 – H400 Aquatic Chronic 1 – H410 (ATP18, 2022)

¹⁷ AMM : autorisation de mise sur le marché

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Penflufen	494793-67-8	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des tubercules/semences : pommes de terre Pas de produit autorisé en France	Approuvée 31/05/2025	Carc. 2 - H351 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP15; 2020)
Penthiopyrad	183675-82-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, cultures légumières, fraisiers, fruitiers Traitement de semences : betteraves	Approuvée 31/05/2025	Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP10; 2017)
Pydiflumétofen	1228284-64-7	N-methoxy-(phenylethyl)-pyrazole-carboxamide			Demande d'approbation en cours	Carc. 2 - H351 Repr. 2 - H361f Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP17 ; 2021)
Sédaxane	874967-67-6	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement de semences : céréales, betteraves et maïs	Approuvée 31/05/2025	Carc. 2 - H351 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 2 - H411 (ATP17 ; 2021)

ANNEXE 4

Tableau 2 : Etablissement des AOEL actuelles et de celles retenues par le GT

Substance	Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Benzovindiflupyr	↓ poids corporel, hypertrophie du foie, de l'hypophyse, et de la zone glomérulaire des surrénales chez les parents Sperme anormal, ↓ des follicules ovariens en croissance et des corporea lutéa et ↑ incidence diestrus lactationnel Chez les petits : ↓ poids corporel, ↑ poids du foie et retard de maturation sexuelle chez les mâles (étude sur 2 générations chez le rat)	6,8	100 (60%)	0,04	↓ motilité spermatique, ↑ incidence diestrus lactationnel, ↓ dépôt glyocogène hépatique (étude sur 2 générations chez le rat)	1,2	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,012 Moyen faible
Bixafen	Hypertrophie du foie et des cellules folliculaires thyroïdiennes (étude 90 jours chez le rat)	12,9	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,13	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			
Boscalid	Perte de poids, effets hépatiques (augmentation du poids et biochimie altérée), augmentation du poids de la thyroïde (étude 1 an chez le chien)	22	100 (44%)	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Carboxine	Lésions rénales (néphropathie chronique) (étude 90 jours chez le rat)	5,5	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,055	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			
Cyflumetofen	Altérations des corticosurrénales et des ovaires (études 90 jours et 2 ans chez le rat)	17	100 (68%)	0,11	Altération des corticosurrénales (étude sur 2 générations chez le rat)	10	100 (68%)	0,07 Moyen
Fluopyram	Effets hépatiques (incluant des effets sur le poids, sur la biochimie et en histologie) (étude 90 jours chez la souris)	5,4	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : faible			
Flutolanil	Augmentation du poids relatif des glandes thyroïdiennes et parathyroïdiennes (mâles). (étude 90 jours chez le rat)	37	100 (70%)	0,26	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			
Fluxapyroxad	Effets hépatiques (augmentation du poids, hypertrophie) (étude 90 jours chez le rat)	6	100 (68%)	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Isofetamid	Baisse du poids corporel. Effets hépatiques (incluant une augmentation du poids du foie, une augmentation des PAL et une hypertrophie) (étude 1 an chez le chien)	5,34	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,05	Mêmes effets hépatiques retenus (étude 90 jours chez le chien)	2,95	Idem dossier réglementaire	0,03 Moyen
Isopyrazam	Effets sur le poids corporel et hépatiques (augmentation du poids et hypertrophie) (étude multigénérationnelle chez le rat)	8	100 (64%)	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Penflufen	Hypertrophie hépatique (étude 1 an chez le chien)	7,7	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,077	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Penthiopyrad	Effets sur le poids, le foie et les surrénales dans la génération P et F1. (étude multigénérationnelle chez le rat)	11	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen
Pydiflumetofen	Augmentation de variants squelettiques chez le foetus. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	10	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen
Sédaxane	Diminution du poids corporel, diminution de la force d'agrippement. (étude 90 jours chez le rat)	28	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,28	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen

Tableau 3 : Etablissement des DJA actuelles et de celles retenues par le GT

Substance	Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Benzovindiflupyr	↓ gain de poids corporel, effets hépatiques (incluant hypertrophie et vacuolisation) et thyroïdiens (adénome) (étude 2 ans chez le rat)	4,9	100	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Bixafen	Effets sur le foie (incluant une hypertrophie et une augmentation du cholestérol) et sur la thyroïde (altération de la colloïde) (étude 2 ans chez le rat)	2	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Boscalid	Effets sur le foie, altération hématologique et biochimique. (étude 2 ans chez le rat)	4,4	100	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			
Carboxine	Ostéodystrophie fibreuse du fémur et hyperplasie parathyroïdienne (étude 2 ans chez le rat)	0,82	100	0,008	Idem dossier réglementaire	Remise en cause de la NOAEL de 0,82 mg/kg pc/j en LOAEL	300	0,0027 Moyen
Cyflumetofen	Altération des corticosurrénales et des ovaires (étude 90 jours et 2 ans chez le rat)	17	100	0,17	Altération des corticosurrénales (étude sur 2 générations chez le rat)	10	100	0,1 Moyen
Fluopyram	Effet sur le foie et la thyroïde (incluant des hypertrophies) et sur les reins (effets dégénératifs). (étude 2 ans chez le rat)	1,2	100	0,012	Idem dossier réglementaire	1,2	300	0,004 Faible
Flutolanil	Modification histologique de la rate avec diminution du nombre de splénocytes (mâles) et diminution de l'hémoglobininémie (femelles) (étude 2 ans chez le rat)	8,7	100	0,09	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Fluxapyroxad	Effets sur le foie (incluant une hypertrophie et des adénomes hépatocellulaires) (étude 2 ans chez le rat)	2,1	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			
Isfetamid	Diminution du poids et du gain de poids corporel (étude 1 an chez le chien)	1,57	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			
Isopyrazam	Effet sur le foie (incluant une hypertrophie) (étude 2 ans chez le rat)	Pas de NOAEL LOAEL = 5,5	200	0,03	Idem dossier réglementaire	Idem dossier réglementaire	300 (LOAEL–NOAEL)	0,018 Moyen faible
Penflufen	Effets sur le foie (incluant une hypertrophie) et sur la thyroïde (incluant une altération de la colloïde) (étude 2 ans chez le rat)	4	100	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			
Penthiopyrad	Effet sur le poids corporel, les surrénales et le foie chez les parents. (étude multigénérationnelle chez le rat)	11	100	0,1	Effets sur les reins (étude sur 2 ans chez le rat)	Pas de NOAEL LOAEL = 9	300 (LOAEL–NOAEL)	0,03 Moyen
Pydiflumetofen	Diminution du poids corporel et effets sur le foie (lésions histologiques) (étude 18 mois chez la souris)	9,2	100	0,09	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			
Sédaxane	Diminution du poids corporel, effets sur le foie et sur la thyroïde (étude 2 ans chez le rat)	11	100	0,11	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen faible			

Tableau 4 : Etablissement des ARfD actuelles et de celles retenues par le GT

Substance	Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD actuelle (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Benzovindiflupyr	Observations cliniques de neurotoxicité (↓ force d'agrippement, activité motrice, température), ↓ gain de poids corporel (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)	10	100	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Bixafen	Diminution du poids maternel et fœtal (étude de toxicité prénatale chez le rat)	20	100	0,2	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			
Boscalid	Le profil toxicologique ne justifie pas la détermination d'une ARfD				Le GT est en accord avec cette conclusion.			
Carboxine	Le profil toxicologique ne justifie pas la détermination d'une ARfD				Le GT est en accord avec cette conclusion.			
Cyflumetofen	Le profil toxicologique ne justifie pas la détermination d'une ARfD				Retard d'ossification (étude de toxicité prénatale chez le rat)	50	100	0,5 Moyen
Fluopyram	Diminution de l'activité locomotrice et motrice (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)	5	100	0,5	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			
Flutolanil	Résorption et mortalité fœtale (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	40	100	0,4	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

Avis de l'Anses
Saisine n° « 2019-SA-0202 »
Saisine liée n°2018-SA-0113

Fluxapyroxad	Effets développementaux chez le lapin (pertes post-implantatoires), diminution du poids des mères et diminution du gain de poids maternel chez le rat (étude de toxicité prénatale chez le rat et le lapin)	25	100	0,25	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Isofetamid	Diminution de la consommation alimentaire chez les mères. Augmentation des variations squelettiques chez les fœtus. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	100	100	1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			
Isopyrazam	Diminution du gain de poids maternel. (étude de toxicité prénatale chez le rat)	20	100	0,2	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			
Penflufen	Diminution de l'activité locomotrice (dans l'étude initiale de neurotoxicité aiguë chez le rat) (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat – follow-up)	50	100	0,5	Diminution de l'activité locomotrice (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat – étude initiale)	Pas de NOAEL LOAEL = 100	300 (LOAEL-NOAEL)	0,33 Faible moyen
Penthiopyrad	Diminution du poids fœtal. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	75	100	0,75	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance: moyen fort			
Pydiflumetofen	Diminution du gain de poids maternel et de la consommation alimentaire. (étude de toxicité prénatale chez le rat)	30	100	0,3	Variations squelettique chez les foetus (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	10	100	0,1 Moyen
Sédaxane	Signes cliniques, diminution de l'activité locomotrice et de la force d'agrippement (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)	30	100	0,3	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

ANNEXE 5

Avis divergent sur la conduite de l'expertise du GT SDHI

Laurence Huc, Anthony Lemarié

Mésestimation des toxicités d'organes des SDHI en fin d'expertise

Objectif : Les membres du GT, après l'examen de tous les dossiers, ont entériné le 14 janvier 2022, la réalisation d'une analyse transversale des effets toxiques des SDHI. Cette analyse, innovante par rapport à l'évaluation réglementaire substance par substance, visait à expliciter les toxicités d'organes communes ou différentes pour tous les SDHI expertisés. Elle a donc une importance capitale pour identifier des effets délétères communs à des substances ayant la même cible pharmacologique, la SDH.

Méthode : Pour traiter de manière cohérente ces aspects, l'analyse a été travaillée collectivement. Ainsi, chaque binôme ou trinôme ayant examiné une SA a reporté dans un tableau à multiples lignes et colonnes les effets toxiques observés dans le dossier réglementaire (foie, rein, perturbation endocrinienne, reprotoxicité, neurotoxicité, développement, maladies des yeux, atteintes des surrénales, atteinte de la thyroïde, autres). Ensuite, des membres volontaires ont pris tous les éléments reportés dans le tableau pour une toxicité donnée et fait la synthèse par effet toxique pour l'ensemble des SDHI. Par exemple, s'agissant de la toxicité rénale, de la thyroïde, des effets ophtalmiques, des surrénales et de la perturbation endocrinienne, les éléments du tableau ont été repris puis vérifiés dans les dossiers eux-mêmes, à la source, afin de s'assurer que toutes les informations avaient bien été rapportées. Afin d'expliquer pourquoi les expert·e·s avaient porté attention à ces effets toxiques, plusieurs membres ont fait un point bibliographique sur l'état de l'art sur la SDH et l'organe/la fonction en question.

Résultat : Cette analyse transversale qui consiste à identifier un effet toxique plus ou moins commun à tous les SDHI, a révélé des atteintes nombreuses et partagées entre les SDHI pour le rein, la perturbation endocrinienne, la neurotoxicité, les maladies oculaires, les atteintes des surrénales, cardiaques, du foie, de la thyroïde.

Exploitation des résultats : Une fois réalisé, ce travail collectif n'a pas été mis à l'ordre du jour assez tôt pour être discuté, bien que la durée de l'expertise aurait permis de le faire. De plus, la démission de 3 expert·e·s, fortement engagés dans la construction de ces parties transversales, a conduit certains membres du GT à ne plus autant les valoriser. *In fine*, certaines de ces parties, dont l'importante partie sur les perturbations endocriniennes, sont reléguées en annexes présentées comme des « contributions personnelles ». D'autres, n'ayant bénéficié ni d'un débat pluraliste et contradictoire, ni d'un temps suffisant, reprennent de façon déséquilibrée la littérature réglementaire par rapport à la littérature académique. L'analyse travaillée collectivement au départ est ainsi très nettement sous-valorisée, sinon invisibilisée et n'est pas éclairée par l'ensemble des connaissances scientifiques sur la mitotoxicité.

La partie transversale sur le foie n'a été abordée en réunion qu'en février 2023, alors que dès la relecture du rapport complet, en septembre 2022, elle avait fait l'objet d'un signalement sur un déséquilibre bibliographique. Ainsi, cette partie ne comportait pas de littérature académique sur la SDH. En revanche, elle comportait de la littérature pour laquelle les auteurs ou

financeurs avaient des conflits d'intérêt sur le sujet (firmes agrochimiques commercialisant les produits, *think-tank* financé par les industriels) et qui avançaient des arguments visant à considérer les atteintes hépatiques comme non pertinentes pour les humains. Ce biais méthodologique n'a pas été réellement discuté en réunion.

Les parties concernant la perturbation endocrinienne, la toxicité rénale, la neurotoxicité, les surrénales, la toxicité oculaire, ont été revues collégalement en GT (septembre et novembre 2022). Une partie de ces contributions a ensuite été passée en annexes, présentées comme des contributions personnelles, ce qui a eu pour effet de déstructurer le rapport, lui faire perdre sa cohérence scientifique et minimiser l'apport des champs de compétences volontairement mobilisés dans l'expertise.

Discussion : Dans un travail d'expertise pluridisciplinaire et collective, il n'est pas d'usage que chaque expert signe sa partie et que ces parties soient mises bout-à-bout. Il s'agit davantage du fruit d'une intelligence et d'un travail collectifs. Ainsi, l'analyse transversale et collective faisait partie intégrante des intentions du GT, puis du pré-rapport revu consensuellement par le GT en septembre 2022. Ne pas pouvoir discuter collégalement de la synthèse de ces parties et/ou les reléguer en annexes présentées comme des contributions personnelles est contraire aux intentions initiales du GT et surtout une mésestimation des résultats obtenus.

Conséquences : Minorer cette analyse transversale a pour conséquence de réduire le champ de l'expertise collective et centrer les résultats sur la question purement réglementaire de l'analyse des VTR. Cependant, l'ambition scientifique du GT n'était pas de se limiter à ces aspects réglementaires, mais d'avoir une vision élargie de la problématique des SDHI. En particulier, il faut pouvoir étudier de manière intégrée la façon dont la prise en compte de la mitotoxicité questionne justement le cadre de l'analyse des VTR.

Restriction de la saisine à des aspects quasi-exclusivement réglementaire

Auditions refusées : Les débats des réunions ont principalement porté sur les VTR et très peu sur les parties transversales. Les propositions d'auditions d'experts externes au GT pouvant apporter des éclairages sur des compétences manquantes (hépatologie, maladies mitochondriales rares, cancers liés à la SDH, atteintes thyroïdiennes) ont toutes été rejetées par la coordination selon des règles peu compréhensibles, à l'exception d'un expert spécialisé en maladies rénales. Une demande d'audition d'un membre du Conseil Scientifique de l'Anses au sujet du [rapport sur la crédibilité de l'expertise scientifique](#) a été rejetée, alors même que des difficultés rencontrées dans le GT faisaient écho à des points faisant l'objet de recommandations dans ce rapport du CS, notamment concernant l'intégration des connaissances scientifiques hors cadre réglementaire.

Blocage épistémique : Le CES VSR, conservant sa manière de fonctionner habituelle, a recommandé : « *La méthodologie habituellement adoptée dans les travaux du CES implique de ne prendre en compte que des effets pertinents au plan sanitaire, présentant une variation statistiquement significative, et dont la relation dose réponse n'est pas incohérente* ». Cette triple condition exclut de fait les pathologies liées à la SDH décrites dans la littérature : la micro-ophtalmie, les phéochromocytomes, les atteintes des corticosurrénales et parfois la toxicité rénale. Elle exclut les maladies rares qui peuvent voir leur incidence augmenter. Ainsi, ce blocage de type épistémique empêche de prendre en compte l'ensemble des connaissances scientifiques.

Supervision scientifique des CES VSR et CES Phyto

Les experts des CES VSR et Phyto auxquels le GT est rattaché n'ont pas d'expertise particulière sur les SDHI et n'ont pas approfondi l'ensemble des dossiers réglementaires. C'est ce qui justifie de la création d'un GT spécifique et composé d'expert.e.s spécialisé.e.s. Le rôle des CES sur le travail du GT SDHI pose des questions de fond en termes d'organisation de l'expertise. En l'occurrence, les retours des CES ont été intégrés par la coordination du GT dans le rapport, sous forme de commentaires ou directement dans la rédaction du rapport. Ces commentaires et parfois réécritures restaient soumis à la validation du collectif d'experts du GT *a posteriori*, ce qui conduisait à une surcharge de travail pour les experts du GT. Cette manière de procéder va à l'encontre du libre choix des membres du GT d'intégrer ou non, et de quelle façon, les retours des rapporteurs afin de renforcer la qualité du travail.

Si un regard plus général sur la production du collectif du GT par les CES est utile pour en clarifier les messages, la question est de savoir jusqu'où cette clarification peut conduire et ne s'apparente pas à une certaine forme de censure ou à une stratégie d'épuisement. On peut, dès lors, se poser la question de savoir quel est l'intérêt de réunir les spécialistes d'un sujet, si les points de vue des non-spécialistes dudit sujet prévalent comme base de restitution.

Fin de l'expertise : perte de la pluralité des expert.e.s et contraintes d'organisation et de temps

En novembre 2022, un expert quitte le GT. En décembre 2022, le retour des CES demandant des modifications très extensives du rapport affecte la conduite de l'expertise. Un nouveau calendrier de nouvelles dates de réunion est imposé. Deux expertes quittent volontairement le GT. Le GT a ainsi perdu en pluralité puisque les démissionnaires étaient expert.e.s des pathologies mitochondriales et du métabolisme, un point particulièrement visé par l'auto-saisine du GT et particulièrement affecté par les modifications demandées par les CES. Notons que l'un des démissionnaires a, entre temps, publié une partie du travail qu'il avait mené dans le cadre du GT, dont certains chapitres n'apparaissent plus dans le rapport final (doi: 10.3390/ijms24044045).

L'obligation d'ajouter des dates de réunion rapides n'a pu être que difficilement gérée (autres activités des expert.e.s extérieurs à l'Anses) et s'est accompagnée d'une augmentation de stress, pression, charge de travail et frustration pour les membres ne pouvant être présents. De fait, des décisions ont été prises sans que tous les avis aient pu être émis, engendrant une perte de pluralité et du principe de contradictoire, lorsque le quorum était cependant atteint.

ANNEXE 6 : ANALYSE DE L'AGENCE DE LA POSITION DIVERGENTE SUR LA CONDUITE DE L'EXPERTISE DU GT SDHI

I/ Contexte et objet de l'annexe

Lors de l'expertise résultant de son auto-saisine, l'Anses a enregistré une position divergente émanant d'une scientifique du groupe de travail SDHI (GT SDHI), relative à « la conduite de l'expertise ». Cette position divergente a été partagée avec l'ensemble du GT SDHI avant la conclusion de ses travaux. Elle a été soutenue, en plus de son auteure, par un autre expert du GT SDHI. Au vu de l'effectif du groupe, elle constitue de ce fait une position minoritaire.

Compte tenu de l'intitulé choisi par l'auteure et de la nature des éléments questionnés, l'Anses n'a pas retenu d'intégrer cette position minoritaire dans le rapport du GT et ses annexes : elle a choisi de l'annexer à son avis, en relation avec le paragraphe 2 traitant de l'organisation de l'expertise.

La présente annexe rend compte de l'analyse par l'Agence des points de cette position relatifs à la méthodologie de l'expertise. Si elle se réfère à des conclusions des différents collectifs mobilisés dans cette expertise, elle n'apporte pas d'éléments d'analyse scientifique supplémentaire à celle menée dans l'expertise.

II/ Place de l'analyse des « toxicités d'organes » dans l'expertise collective menée

L'Agence constate que le rapport du GT SDHI comporte une partie 8 intitulée « toxicité par organes », qui présente l'analyse et les conclusions adoptées collectivement par le GT suite aux travaux menés. Ces conclusions sont déclinées pour chaque organe sous la forme d'un encadré. Elle note également que la conclusion du GT (partie 9) fait référence à cette partie pour l'un de ses alinéas. Le CES VSR indique dans sa conclusion que le choix de méthode d'expertise effectué par le GT SDHI « pour identifier d'éventuels effets communs des SDHI sur certains organes, sans être totalement innovant, est original ».

Le fait qu'une synthèse et des conclusions validées figurent dans le rapport constitue, aux yeux de l'Agence, la marque que le travail sous-jacent sur la toxicité des organes a été synthétisé et exploité dans le cadre de l'expertise collective.

A la fin du rapport, et sans qu'elles n'en constituent à proprement parler des annexes, figurent des contributions personnelles qui ont servi, notamment, de support à la construction de la partie 8. L'Agence note que le volume de ces contributions personnelles est important, et que le temps nécessaire à une validation collective complète aurait été conséquent. Elle renvoie à cet égard au calendrier de l'expertise évoqué au § VII ci-après. Si elle rejoint l'auteure dans son constat qu'il n'est pas d'usage de faire figurer une somme de contributions individuelles dans un rapport d'expertise collective, l'Agence a retenu de les rendre accessibles.

S'agissant de la prise en compte des conclusions tirées par le GT SDHI de ces contributions développant des aspects de toxicité par organe, que l'auteure considère comme une « mésestimation », l'Anses retient le désaccord du CES VSR dans l'exploitation des résultats de l'approche : « Le CES VSR conteste donc que de telles observations puissent être considérées comme un effet, ce qui réduit l'intérêt d'un certain nombre de paragraphes de ce chapitre » (partie 3.2 de l'avis).

III/ Place dans l'expertise de l'analyse des VTR (valeurs toxicologiques de référence)

L'auteure de l'opinion minoritaire exprime par différentes manières des regrets que les travaux se soient concentrés principalement sur l'analyse des VTR, constituant à ses yeux un travail réglementaire.

L'Agence renvoie aux termes de l'autosaisine ainsi qu'aux rappels figurant dans le présent avis sur la nature, le rôle et le mode de détermination de telles VTR. Les VTR constituent avant tout des repères scientifiques - et non strictement réglementaires - résultant d'une analyse méthodique des connaissances disponibles sur la toxicité d'une substance. Plus largement, l'Anses renvoie au guide méthodologique d'élaboration de VTR (Anses, 2017) qui explicite ces modalités d'analyse. La direction de l'Agence ajoute qu'elle est intervenue à plusieurs reprises, à la demande du GT SDHI, pour expliciter le sens et les objectifs de la saisine, ainsi que celui des VTR. Comme cela est rappelé dans les conclusions du CES VSR, la détermination d'une VTR passe par la consolidation d'éléments observés dans les données scientifiques disponibles en vue de constituer des éléments de preuve d'un poids suffisant pour les prendre en compte.

L'Agence note que le GT SDHI s'est saisi du sujet et s'est largement exprimé à travers ses conclusions, y compris en prenant ses distances avec des valeurs actuellement en vigueur et déterminées par le passé dans le cadre des processus réglementaires d'évaluation des substances concernées.

IV/ Les souhaits ou choix d'auditions

Conformément aux principes fondamentaux de l'expertise à l'Anses (§ 10, et procédure R1¹⁸, §6.1.2)¹⁹, Les auditions constituent un des outils à disposition des collectifs d'experts pour mener à bien leurs travaux lorsque des éléments ou connaissances (scientifiques, de terrain...) sont nécessaires pour compléter les données recueillies dans la littérature scientifique ou les dossiers constitués par les pétitionnaires.

Le choix d'y recourir résulte d'une décision du collectif, au vu des manques identifiés dans la progression de l'expertise, de l'apport pressenti, et de la compatibilité avec le calendrier (cf. point VII). Aussi, contrairement à ce qui est indiqué dans l'opinion minoritaire, les auditions n'ont pas été rejetées par la coordination, elles font l'objet d'une décision du collectif d'experts mandaté. Ainsi, le GT SDHI a choisi de réaliser une audition après qu'une liste de question a été élaborée afin d'approfondir un point précis de l'expertise.

S'agissant de la demande de l'auteure d'auditionner un membre du Conseil scientifique de l'Anses, impliqué dans la production du rapport relatif à « la crédibilité de l'expertise scientifique », l'Agence a refusé cette demande pour trois raisons :

- Le Conseil scientifique de l'Anses n'intervient pas dans le déroulement scientifique d'un processus d'expertise. De plus, la sollicitation est intervenue en fin de calendrier, alors que les choix sur la méthode d'expertise avaient été effectués bien plus tôt par le GT SDHI ;
- Il est un organe de conseil de l'Agence, non d'un groupe de travail ou d'un collectif ;
- Enfin, l'avis du Conseil scientifique relatif à la crédibilité de l'expertise était déjà rendu public par l'Agence – et donc accessible – au moment de la sollicitation.

¹⁸ R1 : procédure qualité « produire une expertise sanitaire », incluse dans le système qualité de l'Anses, sous certification ISO 9001

¹⁹ <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-Ft-PrincipesExpertise.pdf>

V/ Les blocages épistémiques

L'auteure de la position minoritaire considère que le processus d'expertise comporte un blocage épistémique qui résulte de l'application, par le CES VSR, de son approche méthodologique. L'exclusion « de fait de certaines pathologies liées aux SDHI décrites dans la littérature » mentionnée par l'auteure ne constitue pas, au sens de l'Agence, une exclusion de principe ou de méthode, mais la mise en application de ses lignes directrices en matière de fixation de valeurs de référence. Ce référentiel est publié et reconnu (guide méthodologique Anses, 2017). Il capitalise également sur le rapport du Conseil scientifique de l'Agence relatif à la prise en compte des incertitudes et du poids des preuves dans les processus d'expertise relatifs aux dangers des substances (Avis Anses, juillet 2016²⁰). En particulier, l'existence d'événements identifiés dans des travaux scientifiques n'est pas ignorée par ce processus, mais pondérée pour distinguer ce qui relève d'un résultat ponctuel de ce qui relève d'effets néfastes ayant un poids suffisant pour être pris en compte dans la fixation de valeurs sanitaires de référence.

VI/ La supervision des CES

Comme le prévoient les textes fondant l'Anses (CSP. L1313-1) et la note de cadrage sur la méthodologie de l'expertise collective à l'Anses²¹, les collectifs qui valident les conclusions des expertises collectives de l'Agence sont les comités d'experts spécialisés (CES). Ils sont créés par délibération du conseil d'administration après avis du Conseil scientifique de l'Agence.

Lorsqu'un sujet s'avère complexe, et en application de sa procédure d'expertise R1, l'Anses peut mandater un collectif d'experts nommés *ad hoc* après appel à candidatures pour préparer l'analyse et formuler des propositions de conclusions, sous l'égide d'un (ou éventuellement de plusieurs) CES.

Comme stipulé dans le mandat signé par le Directeur général, c'est en application de ce cadre que le GT SDHI a été constitué et mandaté, en étant rattaché à deux CES : le CES « Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle », compte tenu de la nature et de l'usage des substances examinées, et le CES VSR compte tenu de l'objet de la saisine.

Le fait qu'un CES puisse intervenir de façon critique sur la méthodologie d'expertise retenue ou sur les résultats d'un GT fait partie du processus d'expertise. Cela mène quasi-systématiquement à des conclusions communes après que les commentaires / observations / recommandations du CES ont été prises en compte. Ces commentaires peuvent, notamment, conduire à hiérarchiser ou clarifier un raisonnement soutenant les conclusions préparées par le GT pour aboutir à des conclusions pleinement partagées.

Dans le cas d'espèce, l'auteure de la position minoritaire considère que ces commentaires ou observations ont été trop nombreux et non légitimes. Dans la mesure où la question centrale de l'expertise consistait à réexaminer la pertinence des VTR au vu des connaissances scientifiques actualisées sur les SDHI et leur mode d'action, l'Agence considère que le CES VSR a toute légitimité pour commenter et interroger le GT sur les raisonnements scientifiques menés. En effet, ce CES porte les propositions de VTR pour un large ensemble de facteurs de risques (substances chimiques, mais aussi particules fines par ex) à partir d'éléments de littératures variés (études toxicologiques, épidémiologiques, données de dossiers

²⁰ [AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif au rapport d'étape sur l'évaluation du poids des preuves à l'Anses : revue critique de la littérature et recommandations à l'étape d'identification des dangers](#)

²¹ https://www.anses.fr/fr/system/files/Anses_note_cadrage.pdf

réglementaires), et ce pour tout type de mode d'action biologique. L'Agence note d'ailleurs qu'après la phase d'échanges entre le GT et le CES les propositions de modification des VTR ont été endossées par les 2 collectifs.

L'Anses souligne qu'il est particulièrement rare qu'un GT et le (ou les) CES au(x)quel(s) il est rattaché ne convergent pas sur leurs conclusions. Pour autant, en cohérence avec les principes de transparence et de prise en compte d'approches contradictoire, elle atteste que les divergences sur certaines conclusions du GT sont restituées dans les différents paragraphes de son avis et, s'agissant des positions minoritaires, intégralement disponibles en annexe du rapport.

VII/ Le calendrier de l'expertise et ses conséquences sur le processus

L'Agence est attentive à la durée globale des travaux d'expertise. Son comité de déontologie et de prévention des conflits d'intérêts recommande ainsi de veiller à ce que cette durée soit délimitée. Si l'engagement calendaire pris par les experts au moment où ils ont fait acte de candidature se trouve largement dépassé, cette situation peut notamment conduire certains d'entre eux à quitter le groupe.

Pour cette expertise, le calendrier initial attaché au mandat du GT SDHI était de 12 mois. A plusieurs reprises, la présidence du collectif, s'exprimant pour le compte des experts, a sollicité l'Agence pour prolonger le mandat au vu de l'ampleur de la tâche et du temps nécessaire au démarrage des travaux pour déterminer la démarche d'expertise. Ainsi, l'Anses a prolongé trois fois le mandat du GT SDHI, tout en faisant mention des fortes attentes externes quant à la finalisation de l'expertise.

Sans préjuger des raisons – par essence propres à chaque personne – qui ont conduit quelques experts à quitter le GT SDHI, trois démissions ont été constatées. S'agissant de l'une d'entre elles, l'expert démissionnaire a fait valoir auprès de l'Agence que sa motivation était un désaccord sur l'approche retenue pour l'expertise. Il est à noter que les éléments apportés par ces différents experts avant leur démission ont alimenté le rapport tel que finalisé et validé.

L'Anses avait fixé à fin mai 2023 la finalisation des travaux du GT SDHI pour que les CES auxquels il était rattaché puissent en disposer. Comme pour beaucoup d'expertises, les phases conclusives ont nécessité la fixation de réunions additionnelles, en accord avec le GT SDHI, pour valider les textes (formulation du rapport et, en particulier, de ses conclusions) dans le cadre du temps restant à courir. La volumétrie du rapport a également pesé sur ce processus de validation.

VIII/ Conclusion

Ainsi, après analyse des différents points soulevés dans la position minoritaire, dont l'Agence note qu'elle a été adoptée par deux des experts du GT SDHI, l'Anses n'identifie pas de manquement ou de pratique s'écartant des principes fondamentaux de l'expertise qu'elle met en œuvre et décline par ses processus de travail, afin de faire vivre les valeurs d'indépendance, de transparence, de discussion contradictoire et de pluralité scientifique.

**Actualisation des données relatives aux
substances phytopharmaceutiques de la famille
des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase
(SDHI)**

Saisine « n° 2019-SA-0202 : SDHI »

**Saisine liée « n° 2018-SA-0113 : Evaluation du signal concernant la toxicité
des substances phytopharmaceutiques inhibiteurs de la succinate
déshydrogénase (SDHI) »**

**RAPPORT
d'expertise collective**

CES « Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle »

CES « Valeurs sanitaires de référence »

**GT « Substances phytopharmaceutiques de la famille des inhibiteurs de la
succinate déshydrogénase (SDHI) »**

Avril 2023

Citation suggérée

Anses. (2022). Rapport du Groupe de Travail « SDHI » relatif à l'actualisation des données relatives aux substances phytopharmaceutiques de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI). (saisine 2019-SA-0202). Maisons-Alfort : Anses, 316 p.

Mots clés

Inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI), substances phytopharmaceutiques, mitochondrie, santé humaine, valeurs toxicologiques de référence

Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI), phytopharmaceuticals, mitochondria, human health, reference toxicological values

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Claude EMOND – Professeur associé à l'université de Montréal - Evaluation du risque, environnementale et professionnel, nanoparticules, interaction mélange, PBPK, pharmacocinétique

Membres

M. Thierry BARON – Chef d'unité « Maladies neuro-dégénératives » à l'Anses - Neurotoxicité, maladies neuro-dégénératives, prions, modèles expérimentaux animaux

Mme Sylvie BORTOLI – Ingénieure de Recherche à l'Université Paris Cité - toxicologie mécanistique, reprogrammation métabolique, cancer, dysfonctionnement mitochondrial, métabolisme énergétique et pathologies

M. Frédéric BOUILLAUD – Directeur de recherche à l'INSERM – Mitochondries, bioénergétique (jusqu'au 01/11/2022)

M. Thomas CLAUDEPIERRE – Professeur des universités - Neurosciences, pathologie neurodégénératives, cultures neuronales primaires, phénotypage comportemental, rétine, neuroprotection

Mme Fatima DJOUADI – Directrice de Recherche à l'INSERM - Métabolisme oxydatif mitochondrial, oxydation des acides gras, chaîne respiratoire, régulation mitochondriale (jusqu'au 31/12/2022)

M. Jérôme HENRI – Chargé de projets de recherche à l'Anses – ADME, toxicologie vitro, PBPK, expérimentation animale

Mme Laurence HUC – Directrice de recherche à l'INRAE - Cancérogenèse environnementale, toxicologie alimentaire, mitotoxicité, stress oxydant, métabolisme énergétique, mécanismes cellulaires de toxicité

M. Anthony LEMARIE – Maître de conférence, Biochimie Clinique et Métabolique à l'Université de Toulouse - Métabolisme mitochondrial, tumeurs cérébrales, cellules souches cancéreuses, radiobiologie, mécanismes de résistance, cancérogenèse, succinate déshydrogénase

Mme Béatrice MORIO-LIONDORE – Directrice de recherche à l'INRAE - Mitochondrie, Mitochondria-ER associated membranes (MAMs), maladies métaboliques chroniques non transmissibles, physiologie, vieillissement, recherche translationnelle (jusqu'au 20/12/2022)

M. Jean-Ulrich MULLOT – Pharmacien en chef, Chef du laboratoire LASEM Laboratoire d'analyses de surveillance et d'expertise de la Marine - Toxicologie réglementaire, réglementation des produits chimiques, évaluation quantitative des risques sanitaires

M. Luc MULTIGNER – Directeur de recherche à l'INSERM – Epidémiologie, pesticides, perturbateurs Endocriniens, reproduction, fertilité, cancers hormono-dépendants

M. Rodrigue ROSSIGNOL – Directeur de recherche à l'INSERM - Mitochondries, Bioénergétique, Maladies Rares, Cancer, Thérapie mitochondriale, Toxicité Mitochondriale

M. Bernard SALLES – Professeur émérite de l'Université de Toulouse - Toxicologie, cancérogenèse, nanotoxicologie, modèles vitro/vivo

M. Ludovic WROBEL – Biologiste de Recherche - oncologie, neurobiologie, neurotoxicité, immunotoxicité, respiration cellulaire

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Département de Néphrologie et Transplantation d'organes ; Centre de Référence des Maladies Rénales Rares ; CHU de Toulouse - INSERM U1297 (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) Université Toulouse III

M. Stanislas FAGUER – MD, PhD, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH)

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	10
Liste des tableaux.....	12
Liste des figures	14
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	15
1.1 Contexte.....	15
1.2 Objet de l'autosaisine.....	15
1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	16
1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts.....	16
2 Méthodologie.....	17
2.1 Recensement des données	17
2.1.1 Dossiers réglementaires.....	18
2.1.2 Revue systématique de la littérature	19
2.2 Recensement des VTR.....	19
2.3 Analyse critique des VTR.....	21
2.4 Toxicité par organes : analyse transversale des effets toxiques pour la famille des substances phytopharmaceutiques SDHI.....	22
3 Sélection des substances actives phytopharmaceutiques SDHI, des usages autorisés et données de vente	23
3.1 Données réglementaires.....	23
3.2 Données de vente.....	28
4 Biochimie de la SDH.....	33
4.1 Fonctionnement de la SDH.....	35
4.2 SDH : aspects métaboliques (cycle de Krebs) et respiratoires (complexe II)	37
4.3 Inhibition de la SDH	40
4.3.1 Inhibiteurs hydrophiles non pesticides : malonate et 3-NP	42
4.3.2 SDHI et autres inhibiteurs du site du coenzyme Q.....	42
4.3.3 Conséquences métaboliques d'une inhibition de la SDH.....	42
5 Evaluations antérieures	45
5.1 Expertise Anses	45
5.2 Expertise INSERM.....	47
6 Analyse des VTR issues de l'évaluation européenne des substances actives.....	50
6.1 Benzovindiflupyr.....	50

6.1.1	Partie toxicocinétique	50
6.1.2	Revue des valeurs de référence	51
6.1.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	58
6.2	Bixafen	59
6.2.1	Partie toxicocinétique	59
6.2.2	Revue des valeurs de référence	59
6.3	Boscalid	63
6.3.1	Partie toxicocinétique	64
6.3.2	Revue des valeurs de référence	64
6.3.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	67
6.4	Carboxine.....	68
6.4.1	Partie toxicocinétique	68
6.4.2	Revue des valeurs de référence	69
6.4.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	72
6.5	Cyflumetofen.....	73
6.5.1	Partie toxicocinétique	74
6.5.2	Revue des valeurs de référence	75
6.5.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	79
6.6	Fluopyram	81
6.6.1	Partie toxicocinétique	81
6.6.2	Revue des valeurs de référence	82
6.6.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	87
6.7	Flutolanil.....	87
6.7.1	Partie toxicocinétique	87
6.7.2	Revue des valeurs de référence	88
6.7.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	92
6.8	Fluxapyroxad	92
6.8.1	Partie toxicocinétique	93
6.8.2	Revue des valeurs de référence	93
6.9	Isofetamid	97
6.9.1	Partie toxicocinétique	97
6.9.2	Revue des valeurs de référence	98
6.9.3	Points d'attention spécifique à la substance	102
6.10	Isopyrazam	102
6.10.1	Partie toxicocinétique	103
6.10.2	Revue des valeurs de référence	104

6.10.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	108
6.11	Penflufen.....	109
6.11.1	Partie toxicocinétique	109
6.11.2	Revue des valeurs de référence	110
6.11.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	114
6.12	Penthiopyrad.....	116
6.12.1	Partie toxicocinétique	116
6.12.2	Revue des valeurs de référence	116
6.12.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	121
6.13	Pydiflumetofen	122
6.13.1	Partie toxicocinétique	122
6.13.2	Revue des valeurs de référence	123
6.14	Sedaxane.....	126
6.14.1	Partie toxicocinétique	126
6.14.2	Revue des valeurs de référence	127
6.14.3	Points d'attention spécifiques à la substance.....	131
6.15	Synthèse du GT concernant la toxicocinétique et les VTR des SDHI	132
7	Dysfonctionnement de la SDH, pathologies et organes cibles	136
7.1	Mutations rares observées.....	136
7.1.1	Déficits héréditaires isolés en complexe II chez l'être humain	137
7.1.2	Régulation de l'expression de la SDH.....	139
7.1.3	Diminution de l'expression de la SDH et cancers	139
7.1.4	Mutations de la SDH chez l'être humain et susceptibilité à certains cancers ...	140
7.1.5	Hypothèse d'une sensibilité particulière aux SDHI des sujets portant une mutation à l'état hétérozygote	142
7.1.6	Effets moléculaires et cellulaires d'une inactivation génétique de la SDH	143
7.1.7	Mutations de la SDH dans des modèles expérimentaux eucaryotes	147
7.2	Inhibition : effets neurologiques de l'exposition expérimentale aux SDHIs non pesticides.....	149
7.3	Atteinte des complexes mitochondriaux lors des maladies neurodégénératives chez l'être humain	150
8	Toxicité par organes.....	153
8.1	Toxicité hépatique.....	153
8.2	Effets sur la thyroïde.....	154
8.2.1	Effets thyroïdiens comme effets critiques des VTR.....	155
8.2.2	Effets hépatiques et thyroïdiens observés dans les études réglementaires	157

8.2.3	Incertitudes sur un mode d'action « phenobarbital-like » des SDHI.....	158
8.3	Effets sur les surrénales	165
8.4	Effets oculaires	170
8.5	Effets neurologiques	175
8.5.1	VTR et effets critiques neurologiques observés dans les études réglementaires 175	
8.5.2	Effets neurologiques observés dans les études réglementaires à des doses supérieures à celles utilisées pour les VTR.....	176
8.5.3	Analyse des conclusions établies par l'EFSA	180
8.6	Effets rénaux.....	181
8.7	Toxicité sur les organes reproducteurs, la reproduction et le développement.....	184
8.8	Autres.....	185
8.8.1	Cardiotoxicité développementale	185
8.8.2	Perturbation endocrinienne	186
9	Conclusion du GT	187
10	Recommandations et perspectives.....	189
	RECO1- Mise en place d'une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques.....	189
	RECO2- Améliorer les connaissances sur les niveaux d'exposition des populations aux SDHI	191
	RECO3- Améliorer les études de pharmacocinétique de manière générale en vue de l'exploitation de données toxicologiques in vitro.....	192
	RECO4- Favoriser le développement des AOP (« <i>adverse outcome pathway</i> »).....	194
	RECO5- Evaluer les effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité	195
11	Bibliographie	197
11.1	Publications.....	197
11.2	Rapports d'évaluation	212
	Annexe 1 : Lettre de saisine	219
	Annexe 2 : Revue systématique de la littérature	221
	Annexe 3 : Outils d'analyse de fixation des niveaux de confiance pour les VTR à seuil	224
	Annexe 4 : Principales propriétés physico-chimiques des pesticides SDHI.....	227
	Annexe 5 : Présentation des positions divergentes	228
	CONTRIBUTIONS PERSONNELLES	247
	Contribution personnelle : Structure du complexe SDH et conservation interespèces	248

Contribution personnelle : Mutations retrouvées dans les déficits héréditaires isolés en complexe II chez l'humain	248
Contribution personnelle : Données sur le cyflumetofen.....	253
Contribution personnelle : Physio-pathologie de la glande thyroïde : comparatif entre les rongeurs, les canins et les humains	257
Contribution personnelle : Hormones thyroïdiennes et fonction hépatique	283
Contribution personnelle : Analyse de la bibliographie sur la neurotoxicité de l'acide 3-nitropropionique, du malonate et du 2-thenoyltrifluoroacétone, des inhibiteurs pharmacologiques de la SDH.....	289
Contribution personnelle : Pathologies rénales.....	295
Contribution personnelle : Perturbations endocriniennes	299
Contribution personnelle : Incertitudes dans les évaluations des dossiers réglementaires analysées par le GT	306
Contribution personnelle : Etudes sur les organismes de l'environnement	313

Sigles et abréviations

ADME	:	Absorption distribution métabolisation élimination
ADP	:	Adénosine diphosphate
AH	:	Adénome hypophysaire
ALAT	:	Alanine aminotransférase
AMM	:	Autorisation de mise sur le marché
AOEL	:	Acceptable operator exposure level
ARfD	:	Acute reference dose
ASAT	:	Aspartate aminotransférase
ATP	:	Adénosine TriPhosphate
BNVD	:	Banque Nationale des Ventes de Produits
CES	:	Comité d'Experts Spécialisé
COAD	:	Colon adenocarcinoma
DJA	:	Dose journalière admissible
ECHA	:	European chemicals agency
EFSA	:	European food safety agency
FRAC	:	Fungicide Resistance Action Committee
GIST	:	Gastro-Intestinal Stroma Tumor
GLDH	:	Glutamate deshydrogenase
GT	:	Groupe de travail
HCD	:	Historical control data
IHC	:	Immuno-histochimie
IMS	:	Intermembrane space
IRAC	:	Insecticide resistance action committee
FAD	:	Flavine adénine dinucléotide
FRAC	:	Fungicide resistance action committee
KICH	:	Kidney chromophobe

KIRC	:	Kidney renal clear cell carcinoma
KIRP	:	Kidney renal papillary cell carcinoma
LIHC	:	Liver hepatocellular carcinoma
MTT	:	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NADH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite
NAFLD	:	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	:	Non-alcoholic steato hepatitis
NBT	:	Nitro blue tetrazolium
3-NP	:	3 Nitropropionic acid
PAL	:	Phosphatase alcaline
PC	:	Poids corporel
PCC	:	Phéochromocytomes
PGL	:	Paragangliomes
PMS	:	Phenazine metosulfate
PPP	:	Produit phytopharmaceutique
RAC	:	Risk assessment committee
RCC	:	Renal cell carcinoma
READ	:	Rectum adenocarcinoma
ROS	:	Reactive oxygen species
SA	:	Substance active
SKCM	:	Skin cutaneous melanoma
SDH	:	Succinate deshydrogenase
SDHAF	:	Succinate dehydrogenase complex Assembly Factor
SDHI	:	Succinate deshydrogenase inhibitor
TCA	:	Tricarboxylic acid
TTFA	:	2-thenoyltrifluoroacetone
VTR	:	Valeur toxicologique de référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identité et statut réglementaire dans l'UE des SDHI considérés dans l'expertise	24
Tableau 2 : Ventes en France en quantité de SA (kg)	29
Tableau 3: liste des recommandations issues de l'expertise du GECU (Anses 2019)	46
Tableau 4 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j	51
Tableau 5 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr	54
Tableau 6 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr	56
Tableau 7 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr	57
Tableau 8 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen	60
Tableau 9 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen	62
Tableau 10 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen	63
Tableau 11 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le boscalid	65
Tableau 12 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le boscalid	67
Tableau 13 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour la carboxine	70
Tableau 14 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour la carboxine	71
Tableau 15 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen	76
Tableau 16 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen	78
Tableau 17 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen	79
Tableau 18 : Occurrence des malformations oculaires chez le rat Br/Han:WIST@Tac(GALAS) dans l'étude de toxicité prénatale (0, 50, 250 et 1000 mg/kg pc/j) et dans les données de contrôles historiques de l'éleveur	80
Tableau 19 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram ...	83
Tableau 20: Mortalité et taux de survie après 104 semaines (étude chez le rat, réalisée avec le fluopyram ; partie cancérogénicité)	84
Tableau 21 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram	85
Tableau 22: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram	86
Tableau 23: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil	89
Tableau 24: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil	90
Tableau 25: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil	91
Tableau 26: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad	94
Tableau 27: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad.	95
Tableau 28: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad	96
Tableau 29 : NOAEL et LOAEL pour les effets hépatiques dans les études de 90 jours et d'1 an chez le chien	98
Tableau 30: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid	99
Tableau 31: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid	100
Tableau 32: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid	101
Tableau 33 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j	104
Tableau 34: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam ..	105
Tableau 35: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam ...	106
Tableau 36: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam ...	107

Tableau 37: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen ...	111
Tableau 38: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen	112
Tableau 39: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen....	114
Tableau 40 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j	116
Tableau 41: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad	117
Tableau 42 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j	118
Tableau 43: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad	119
Tableau 44: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad	120
Tableau 45 : Occurrence des malformations oculaires chez le lapin New Zealand dans les différentes conditions de traitement (0 à 225 mg/kg pc/j) et en relation avec les données de la littérature (a : Ema <i>et al.</i> , 2012 et b : contrôles historiques de l'éleveur).....	121
Tableau 46: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen	123
Tableau 47: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen	125
Tableau 48: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen	126
Tableau 49: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le sedaxane....	128
Tableau 50: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le sédaxane	129
Tableau 51: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le sedaxane	130
Tableau 52 : Synthèse des conclusions du GT sur les VTR des SDHI considérés sur la base des données actuelles.....	134
Tableau 53: Organes cibles et signes cliniques des déficits héréditaires isolés en complexe II (Fullerton et al. 2020).....	138
Tableau 54: Fréquence des mutations sur les différents gènes codant la SDH (MacFarlane et al. 2020)	141
Tableau 55 : Effets critiques des SDHI sur la thyroïde et le foie retenus dans la détermination des VTR retenues par le GT.....	156
Tableau 56. Schéma récapitulatif des données correspondant à un effet sur la glande thyroïde	158
Tableau 57 : Effets des SDHI sur la thyroïde et le foie d'après les études court ou long terme chez les rongeurs et/ou le chien	161
Tableau 58 : Tumeurs surrenaliennes chez le rat mâle exposé pendant 24 mois au bixafen	166
Tableau 59: Résumé des effets observés sur les surrénales avec le cyflumetofen	166
Tableau 60 : Résumé des atteintes oculaires décrites dans les dossiers réglementaires et rapportées dans la littérature pour les 14 SDHI évalués par le GT	171
Tableau 61: Effets critiques neurologiques des SDHI utilisés dans la détermination de VTR.....	176
Tableau 62 : Effets neurologiques des SDHI non impliqués dans la détermination des VTR d'après les études court ou long terme chez les rongeurs et/ou le chien.....	178
Tableau 63: Liste des mots-clés utilisés pour la requête bibliographique	221
Tableau 64 : Données de physico-chimie des SDHI considérés dans l'expertise (source conclusions de l'EFSA).....	227

Liste des figures

Figure 1 : Méthode de travail suivie par le GT SDHI	17
Figure 2 : Représentation schématique de la division du continuum de confiance en cinq niveaux et terminologie correspondante	22
Figure 3 : Ventes de SDHI entre 2008 et 2020 en France en tonnage de SA par an.....	30
Figure 4 : Ventes de SDHI entre 2008 et 2020 en France en % (en masse) de SA par an	31
Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale et phosphorylation oxydative, adapté de (Lemarie et Grimm 2011)	35
Figure 6 : Structure de la SDH (adapté de (Moosavi et al. 2020; Her et Maher 2015)	36
Figure 7: Substrats, topologie de la SDH/complexe II (Frederic Bouillaud 2023)	37
Figure 8: Les deux sens de la réaction SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	37
Figure 9: Bioénergétique cellulaire, cycle de l'ATP, métabolisme et phosphorylation oxydative (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	38
Figure 10 : Oxydation du glucose, voie métabolique et intervention des complexes I à V de la phosphorylation oxydative (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	39
Figure 11: Cycle de Krebs (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	39
Figure 12: Inhibiteurs de SDH hydrophiles (listés à gauche) et inhibiteurs de SDH de type 'SDHI' hydrophobes (listés à droite) (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	41
Figure 13 : Accepteurs d'électrons pour différentes méthodes de dosage de la SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)	41
Figure 14: Niveaux d'inhibition de la SDH et conséquences (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT).....	43
Figure 15 : Conséquences métaboliques de l'inhibition de la SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT).....	44
Figure 16 : Identification des organes cibles des SDHI par analogie.....	136
Figure 17 : Théorie des deux « hits » de Knudson	140
Figure 18: Schématisation de l'hypothèse d'une sensibilité aux SDHI pour des individus porteurs de mutations à l'état hétérozygote à développer des cancers.....	143
Figure 19 : Toxicité thyroïdienne des SDHI et MoA	155
Figure 20: Liaison d'un inhibiteur de la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	195
Figure 21 : Diagramme de flux	223

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

À la suite d'une alerte d'un collectif de scientifiques concernant les risques pour la santé humaine que pourrait présenter l'utilisation de fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), l'Anses s'est autosaisie le 24 mai 2018 afin de déterminer si les informations et hypothèses scientifiques mentionnées par ces scientifiques apportaient, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives fongicides concernées. Le 14 janvier 2019, l'Anses publiait un avis qui concluait que les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte n'apportaient pas d'élément en faveur de l'existence d'alerte sanitaire pouvant conduire au retrait des autorisations de mise sur le marché de ces fongicides (Anses 2019). L'Anses lançait cependant un appel à la vigilance aux niveaux européen et international, et soulignait la nécessité de renforcer la recherche sur de potentiels effets toxiques chez l'humain.

Le 6 décembre 2019, l'Anses s'est saisie pour actualiser les données de la littérature scientifique publiées depuis l'approbation des substances fongicides SDHI afin d'identifier si des éléments nouveaux pouvaient, d'une part, nécessiter une mise à jour de l'avis et du rapport du groupe d'expertise collective de janvier 2019 et, d'autre part, justifier une modification des évaluations réglementaires menées au niveau européen sur les substances de la famille des SDHI.

1.2 Objet de l'autosaisine

Les questions posées au GT SDHI sont les suivantes (Annexe 1) :

- *l'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, la pharmacocinétique doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances ? A cet égard, une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI ;*
- *l'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances ?*
- *au regard de ces éléments, si des modifications des valeurs toxicologiques de référence (VTR) des substances SDHI sont considérées nécessaires, des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen.*

Cette expertise se focalise sur l'identification et la caractérisation des dangers, *via* l'analyse des données de la littérature et des valeurs toxicologiques de référence (VTR) existantes pour ces substances. Cette expertise ne couvre pas les notions d'exposition, ni de risque.

1.2.1 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

1.2.1.1 Moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « SDHI » (GT SDHI), mis en place en octobre 2020, rattaché aux comités d'experts spécialisé (CES) « Substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle » (CES phyto BC) et « Valeurs sanitaires de référence » (CES VSR).

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

Le rapport a été validé par le GT SDHI lors des séances des 14, 17 et 18 avril 2023. Les experts ayant démissionné ont contribué aux travaux du GT jusqu'à la date de leur démission (cf page 3), ils n'ont pas donc validé la version finale du rapport.

Le rapport a été proposé pour validation le 11 mai au CES VSR et le 6 juin au CES phyto BC. Les conclusions des CES figurent dans la partie 3 de l'avis.

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

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

La méthodologie suivie par le GT SDHI est décrite dans la section 2.

Les positions divergentes figurent dans l'Annexe 5 : Présentation des positions divergentes. De plus, une position divergente concernant la conduite de l'expertise est annexée à l'avis associé au rapport.

1.2.1.2 Autres moyens mis en œuvre et organisation

Le GT a auditionné le professeur Stanislas Faguer¹ le 21 avril 2022 concernant les questions soulevées par le GT sur la néphrotoxicité potentiellement induite par l'exposition de modèles animaux à des SDHI.

Des contributions personnelles, non validées par l'ensemble du GT mais endossées par un ou plusieurs experts et contenant des informations additionnelles en lien avec les questions de la saisine, figurent à la suite des annexes du rapport.

1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

¹ Département de Néphrologie et Transplantation d'organes ; Centre de Référence des Maladies Rénales Rares ; CHU de Toulouse - INSERM U1297 (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) Université Toulouse III

2 Méthodologie

L'objectif de cette autosaisine est d'« actualiser les données de la littérature scientifique publiée depuis l'approbation des substances fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) afin d'identifier si des éléments nouveaux pourraient, d'une part, nécessiter une actualisation de l'avis et du rapport du groupe d'expertise collective et, d'autre part, justifier une modification des évaluations menées au niveau européen sur les substances de la famille des SDHI ».

Pour ce faire, le GT SDHI a suivi la méthodologie suivante :

- Sélection des substances actives (SA) phytopharmaceutiques SDHI à inclure dans l'expertise. Il s'agit de celles ayant eu une évaluation européenne disponible au moment des travaux (Tableau 1). Pour ces SDHI, les statuts réglementaires et les données de vente ont été recensés ;
- Rappel de la biochimie de la SDH et des évaluations nationales antérieures (Anses 2019; Baldi et al. 2021; Inserm 2021) ;
- Recensement des VTR et analyse critique au regard des dossiers réglementaires et d'une revue systématique de la littérature ;
- Etat des connaissances concernant un dysfonctionnement de la SDH, les pathologies et les organes cibles ;
- Toxicité par organes : analyse transversale des effets toxiques des SDHI.

Il est à noter que seuls les effets néfastes ont été considérés dans ce rapport.

Les principales étapes sont récapitulées en Figure 1.

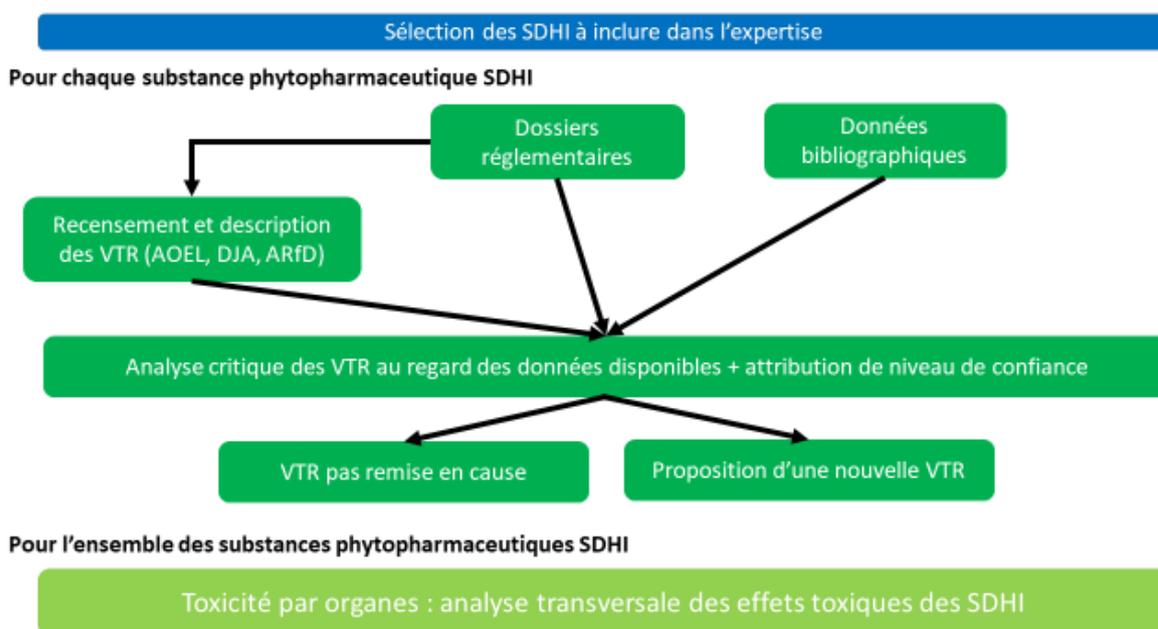


Figure 1 : Méthode de travail suivie par le GT SDHI

2.1 Recensement des données

Le GT a recensé les données issues des dossiers réglementaires et a réalisé une recherche systématique de la littérature.

2.1.1 Dossiers réglementaires

Le règlement (CE) 1107/2009 du 21 octobre 2009 définit, pour l'ensemble des États membres, les conditions d'approbation des SA et de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. La décision d'approbation ou de ré-approbation d'une substance active revient à la Commission Européenne après évaluation scientifique par l'EFSA (« European food safety agency » ou Autorité européenne de sécurité des aliments).

Les produits phytopharmaceutiques sont des préparations composées d'une ou plusieurs SA, responsables des propriétés du produit et de substances appelées co-formulants, donnant au produit une forme appropriée à son application.

Le référentiel de l'évaluation des dangers et des risques est le règlement (CE) 1107/2009. Celui-ci est complété par des règlements d'exécution et notamment le règlement (UE) n°546/2011, qui porte sur les critères d'acceptabilité du risque. Ces documents indiquent les données techniques que doivent contenir les dossiers, ainsi que les méthodes à mettre en œuvre pour les obtenir, et précisent, le cas échéant, les valeurs seuils au-delà desquelles le risque doit être considéré comme inacceptable ou des essais complémentaires nécessaires pour affiner l'évaluation. Ces règlements, complétés par divers documents guides, permettent que l'évaluation des dossiers soit réalisée de façon harmonisée d'un État membre à l'autre.

Ainsi, lorsqu'une société souhaite l'approbation d'une nouvelle SA au titre du règlement (CE) n°1107/2009, elle constitue un dossier qu'elle dépose auprès de l'État membre de son choix. Le dossier relatif aux SA permet de caractériser les propriétés intrinsèques de ces substances et donc les dangers qu'elles présentent, pour l'humain et l'environnement. Cet État membre, désigné comme « rapporteur », examine le dossier et rédige un projet de rapport d'évaluation, qui est adressé à l'EFSA. L'EFSA transmet ce projet aux autres États membres, recueille leurs commentaires et organise les discussions entre les experts de ces États membres. Le rapport d'évaluation final de l'EFSA est envoyé pour examen à la Commission européenne, qui propose une décision d'approbation ou de non-approbation. En France, c'est l'Anses qui est en charge de l'examen du dossier lorsque la France est l'État-membre rapporteur pour une SA. Après approbation des substances actives à l'échelon européen, les produits commerciaux contenant ces substances sont ensuite évalués par zone géographique² réunissant plusieurs pays, l'autorisation de mise sur le marché s'effectuant enfin au niveau de chaque État membre.

Le GT SDHI s'est basé sur les différentes données issues de ce processus d'évaluation des SA, à savoir :

- les volumes 1 (résumé de l'évaluation réglementaire) et 3B6 (données de toxicologie et de métabolisme) du rapport d'évaluation, rédigés par des États membres rapporteurs sur la base des données soumises par les notifiants industriels dans le cadre de la réglementation (CE) n° 1107/2009,
- les conclusions de l'EFSA,
- les rapports d'études soumis par les industriels lorsqu'il y avait besoin d'obtenir des données complémentaires (les études toxicologiques mises en place dans le cadre de la réglementation phytopharmaceutique étant rarement publiées).

D'autre part, le GT a également pris en compte les propositions de classification rédigées par un État-membre rapporteur (CLH report) et/ou les conclusions du comité d'évaluation des risques (RAC ou « Risk assessment Committee ») de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA ou « European Chemical Agency »), dans le cadre du règlement CLP n°1272/2008 relatif à la classification et l'étiquetage des substances et produits chimiques.

² Trois zones ont été définies dans l'Union européenne. La France appartient à la zone Sud.

2.1.2 Revue systématique de la littérature

Une revue systématique de la littérature a été réalisée afin d'identifier des études toxicologiques qui remettraient en cause les VTR telles que définies par la réglementation européenne actuelle et d'identifier des effets critiques spécifiques à une inhibition de la SDH. Les détails sont présentés dans l'Annexe 2.

2.2 Recensement des VTR

Pour les substances phytopharmaceutiques, trois VTR principales sont établies dans les dossiers réglementaires :

- **l'AOEL** (Acceptable Operator Exposure Level), **ou niveau acceptable d'exposition de l'opérateur**, est la quantité maximale de SA à laquelle l'opérateur³ peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé. Il est à noter que pour prendre en compte l'ensemble des voies d'exposition, l'AOEL est corrigée par l'absorption orale afin d'être exprimée en dose « interne » (Commission européenne 2006). Quand celle-ci est supérieure ou égale à 80%, aucune correction n'est apportée. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel par jour. Elle est utilisée pour évaluer le risque pour les opérateurs, les travailleurs⁴, les résidents⁵ et les personnes présentes⁶ *via* une exposition par voie cutanée et respiratoire (et par voie orale pour les enfants pour prendre en compte la contamination mains-bouche *via* les objets ou le sol). Elle est basée sur des études subchroniques par voie orale chez l'animal (typiquement, étude de 90 jours chez le rongeur ou d'un an chez le chien). Si un effet plus sensible et pertinent est identifié dans une autre étude (p. ex. étude de neurotoxicité, étude sur la reproduction et/ou développement) il est possible de l'utiliser. Il est également possible d'utiliser une étude long-terme si l'effet critique aurait pu être initié après une exposition à plus court terme (Commission européenne 2006).
- **la dose journalière admissible (DJA)** (ou « Acceptable Daily Intake » (ADI)) est une estimation de la quantité de SA présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS 1997). Elle est utilisée pour évaluer le risque chronique pour le consommateur *via* une exposition alimentaire (par voie orale). Elle est construite sur la base d'études long-terme chez l'animal (p. ex. études de 2 ans chez le rat).
- **l'ARfD** (Acute Reference Dose) **ou dose de référence aiguë**, est la quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée sur une brève période, en

³ L'opérateur est un professionnel de l'agriculture qui pratique des activités liées à l'application de pesticides, comme mélanger et verser des pesticides dans des machines, ainsi que faire fonctionner, nettoyer, vider ou réparer ces équipements.

⁴ Les travailleurs sont les personnes qui, dans le cadre de leur travail, pénètrent dans des zones où sont utilisés des pesticides, ou qui manipulent des récoltes traitées avec ces produits chimiques.

⁵ Les résidents sont les personnes qui vivent, travaillent ou vont à l'école à proximité d'une zone où sont utilisés des pesticides et qui ne prennent pas de mesures de protection, telles que le port de vêtements spéciaux, pour réduire l'exposition.

⁶ Les personnes présentes sont les personnes pouvant se trouver au sein ou à proximité d'une zone traitée avec des pesticides et qui ne prennent pas de mesure de protection.

général au cours d'un repas ou d'une journée, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS 1997). Elle est utilisée pour évaluer le risque aigu pour le consommateur *via* une exposition alimentaire de courte durée (par voie orale). En particulier, il y a besoin de fixer une ARfD lorsque les alertes toxicologiques suivantes sont présentes (Commission européenne 2001) :

- mortalité après une faible dose unique orale ;
- effets sur le développement sauf lorsqu'ils sont clairement la conséquence d'une toxicité maternelle ;
- effets observés de manière précoce dans les études en doses répétées incluant les effets sur le comportement, le système gastro-intestinal, le système cardiovasculaire ou le système respiratoire ;
- neurotoxicité aiguë ;
- altérations hormonales ou biochimiques observées dans les études répétées mais qui aurait pu être induite par une dose unique.

Les études pertinentes pour fixer une ARfD sont les études de toxicité répétée (28 ou 90 jours), les études sur le développement et les études de neurotoxicité aiguë. Lorsque qu'une étude de neurotoxicité aiguë est disponible, elle est souvent la plus pertinente pour la détermination d'une ARfD.

Ces valeurs sont établies à partir de la dose critique (ou point de départ, c'est-à-dire d'une NOAEL, LOAEL ou d'une BMDL⁷) identifiée dans les études toxicologiques (études clés) et en prenant en compte des facteurs d'incertitude.

La majorité des facteurs d'incertitude sont des facteurs par défaut pour tenir compte de la variabilité entre l'animal et l'humain (variabilité inter-espèces ; en général, un facteur de 10) et au sein de l'espèce humaine (variabilité inter-individuelle ; en général, un facteur de 10). D'autres facteurs additionnels peuvent également être appliqués pour tenir compte, par exemple, d'une extrapolation de LOAEL à NOAEL, de la sévérité d'un effet, des incertitudes en lien avec la qualité de la base de données ou de l'extrapolation de durée d'exposition.

Les DJA et les ARfD sont calculées selon la formule ci-dessous.

$$VTR = \frac{\text{Dose Critique (i. e. NOAEL, LOAEL, ou BMDL)}}{\text{Facteurs Incertitude}}$$

Pour l'AOEL, le calcul est réalisé selon la formule ci-dessus en considérant l'absorption par voie orale afin d'être exprimée en dose interne.

Les méthodologies décrivant les étapes pour la dérivation de ces VTR sont disponibles dans des documents guides dédiés (p. ex : OMS 1997; 2015; Commission européenne 2001; 2006; EFSA 2012; 2013).

Les VTR sont décrites dans les conclusions de l'EFSA et dans le volume 1 des rapports d'évaluation réglementaire.

⁷ Il est à noter que les VTR élaborées dans le cadre de la réglementation phytopharmaceutique sont rarement basées sur une BMDL

2.3 Analyse critique des VTR

Les questions de la saisine se focalisent sur la nécessité ou non de faire évoluer les valeurs de référence actuelles disponibles, à savoir l'AOEL, la DJA et l'ARfD, au niveau européen.

La description et l'analyse critique des VTR ont été réalisées, en premier lieu, à partir des dossiers réglementaires et, des données de la littérature, si des données pertinentes pour l'élaboration des VTR avaient été identifiées (voir sections 2.1.1 et 2.1.2). Ainsi, l'objectif de ce rapport n'était pas de réaliser un profil toxicologique de chacune des substances. L'ensemble des études disponibles n'est donc pas présenté dans ce rapport (cette information est disponible sur le site de l'EFSA, en particulier dans le volume 3B6, détaillant les données de toxicologie et de métabolisme).

L'autosaisine indiquant la possibilité de porter les modifications de VTR, telles que proposées par le GT, au niveau européen, cette analyse critique a été réalisée au regard de la méthodologie habituellement utilisée dans le cadre du règlement (CE) 1107/2009.

Le GT s'est concentré sur les choix réalisés pour élaborer ces VTR en se focalisant sur :

- la qualité des études clés,
- une analyse de la pertinence des effets critiques retenus,
- le choix de la dose critique.

Le GT s'est en particulier assuré que les doses critiques utilisées comme points de départ des VTR étaient les plus conservatrices au regard de l'ensemble des études pertinentes pour leur dérivation (voir 2.2).

Afin d'indiquer les limites des VTR existantes ou proposées dans cette expertise, le GT a proposé des niveaux de confiance.

Conformément à son guide méthodologique d'élaboration des VTR (Anses 2017), l'Anses attribue généralement un niveau de confiance global à chaque VTR. Même si cela n'est pas fait dans le cadre de la réglementation phytosanitaire, cette approche a été suivie par le GT. L'outil de fixation des niveaux de confiance pour les VTR adapté a été utilisé afin de proposer une démarche transparente et reproductible d'une substance à l'autre et d'un évaluateur à l'autre (voir Annexe 3 : Outils d'analyse de fixation des niveaux de confiance pour les VTR à seuil). Celui-ci se fonde sur plusieurs critères correspondant à différentes étapes de construction des VTR : la nature et la qualité du corpus de données, le choix de l'effet critique et mode d'action, le choix de l'étude clé et le choix du point de départ. Certains ont été divisés en plusieurs sous-critères afin que l'évaluateur tienne compte de tous les aspects qui les caractérisent. Pour chaque sous-critère, un niveau de confiance de 1 à 5 est affecté, associé avec une argumentation/justification. Les niveaux de confiance de chaque sous-critère sont combinés pour déterminer un niveau de confiance global pour chaque critère puis, pour la VTR. Le niveau de confiance global, automatiquement calculé par l'outil, peut prendre cinq valeurs :

- une confiance faible avec des scores compris entre 1 et 1,8,
- une confiance moyenne / faible avec des scores compris entre 1,9 et 2,6,
- une confiance moyenne avec des scores entre 2,7 et 3,4,
- une confiance moyenne/élevée avec des scores entre 3,5 et 4,2,
- une confiance élevée avec des scores entre 4,3 et 5.



Figure 2 : Représentation schématique de la division du continuum de confiance en cinq niveaux et terminologie correspondante

2.4 Toxicité par organes : analyse transversale des effets toxiques pour la famille des substances phytopharmaceutiques SDHI

L'autosaisine indiquait qu'« *une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI* ». Le GT a ainsi réalisé en complément une analyse transversale des effets toxiques communs à plusieurs SDHI étudiés au regard de la toxicité mitochondriale. Ces éléments sont décrits dans la section toxicité par organe (chapitre 8).

3 Sélection des substances actives phytopharmaceutiques SDHI, des usages autorisés et données de vente

3.1 Données réglementaires

Les substances concernées par cette expertise sont les SA visées au sens de la réglementation (EC) No 1107/2009.

En particulier, les SA phytopharmaceutiques (fongicides et acaricides) prises en compte sont celles :

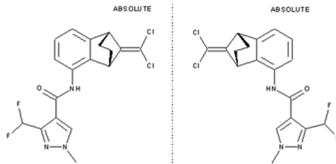
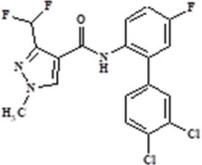
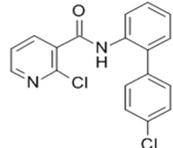
- incluses dans le groupe 7 (*complex II : succinate dehydrogenase*) selon la classification du comité d'action contre la résistance aux fongicides (Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)) ou dans le groupe 25 (*mitochondrial complex II electron transport inhibitors*) selon la classification du comité d'action contre la résistance aux insecticides (Insecticide Resistance Action Committee (IRAC)) et
- ayant eu une évaluation communautaire, c'est-à-dire une évaluation au niveau européen, disponible au début des travaux.

Il est à noter que, parmi celles-ci, certaines ont fait l'objet d'un non-renouvellement de leur approbation pendant les travaux du GT.

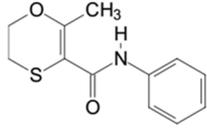
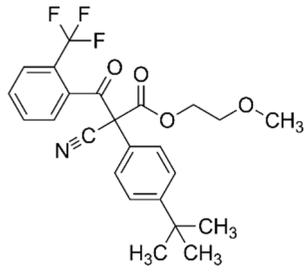
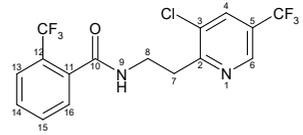
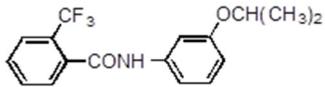
Les substances pour lesquelles il n'y avait pas de dossier communautaire (et donc pas de VTR disponibles) au début des travaux du GT n'ont pas été considérées dans le cadre de cette expertise. En particulier, les conclusions de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) concernant l'isoflucypram ont été publiées en juin 2022. Cette publication arrivant tardivement au regard des délais de ces travaux, cette substance n'a pas été analysée dans ce contexte.

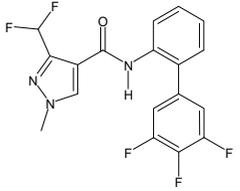
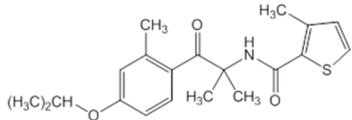
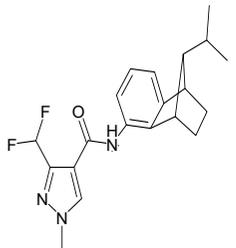
L'identité des substances considérées et les données réglementaires sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Identité et statut réglementaire dans l'UE des SDHI considérés dans l'expertise

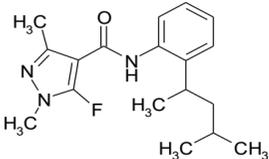
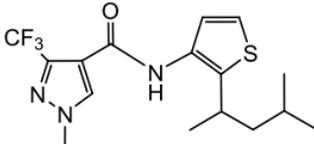
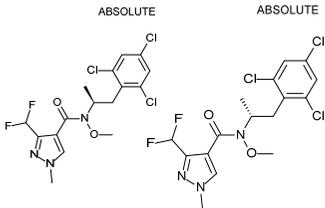
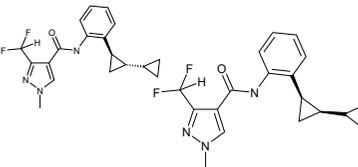
Liste SDHI (source : FRAC et IRAC)	Numéro CAS	Famille chimique	Structure chimique	Principaux types d'usages en France (ephy, 24/04/2023)	Date de fin d'approbation de la SA ⁸	Classification harmonisée et opinions du RAC ⁹
Benzovindiflupyr	1072957-71-1	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, gazons (greens et tees de golfs)	Approuvée 02/03/2024	Acute tox 3 - H301 / H331 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP9; 2016)
Bixafen	581809-46-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, crucifères oléagineuses	Approuvée 31/05/2025	Pas de classement
Boscalid (ancien nom : nicobifen)	188425-85-6	Pyridine-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, vigne, arboriculture, crucifères oléagineuses, graines protéagineuses, légumineuses, soja, tournesol, lin, légumes, cultures porte-graines	Approuvée 15/04/2026	Pas de classement

⁸ SA : substance active⁹ les opinions du RAC ont été renseignées dans les cas où celles-ci n'ont pas encore été implémentées dans la réglementation CLP.

Carboxine	5234-68-4	Oxathiin carboxamide		Traitement de semences : céréales	Non approuvée 31/05/2021	Skin Sens. 1 - H317 STOT RE 2 - H373 (reins) Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP14; 2019)
Cyflumetofen	400882-07-7	benzoylacétoni trile		Acaricide Traitement des parties aériennes : cultures florales, plantes vertes et fraisiers (uniquement autorisé sous abri hors-sol)	Approuvée 31/10/2025	Carc. 2 – H351 Skin Sens. 1A – H317 (ATP14; 2019)
Fluopyram	658066-35-4	Pyridinyl-ethyl-benzamide		Traitement des parties aériennes : céréales, arboriculture, cultures légumières, oléagineux, bananes, gazons (golfs et terrains de sport) Traitement du sol : cultures légumières et ornementales (usage fongicide et nématicide)	Approuvée 31/01/2024	Aquatic chronic 2 - H411 (ATP9; 2016)
Flutolanil	66332-96-5	Phenyl benzamide		Traitement des tubercules/semences : pommes de terre	Approuvée 29/02/2024	Pas de classement

Fluxapyroxad	907204-31-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement de semences et des parties aériennes : céréales, arboriculture, cultures légumières, cultures porte-graines Traitement du sol : pommes de terre	Approuvée 31/05/2025	Lact - H362 Aquatic acute 1 - H400 Aquatic chronic 1 - H410 (ATP15; 2020)
Isofétamid	875915-78-9	Phenyl-oxo-ethyl thiophene amide		Traitement des parties aériennes : vigne, arboriculture, fraisiers, fines herbes, laitue, crucifères oléagineuses	Approuvée 15/09/2026	Pas de classement
Isopyrazam	881685-58-1	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : plantes ornementales (date limite du retrait des AMM ¹⁰ des produits par les états membres : 08/09/2022)	Non approuvée 08/06/2022	Carc. 2 – H351 Repr. 1B – H360D Skin Sens. 1B – H317 Aquatic Acute 1 – H400 Aquatic Chronic 1 – H410 (ATP18, 2022)

¹⁰ AMM : autorisation de mise sur le marché

Penflufen	494793-67-8	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des tubercules/semences : pommes de terre Pas de produit autorisé en France	Approuvée 31/05/2025	Carc. 2 - H351 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP15; 2020)
Penthiopyrad	183675-82-3	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement des parties aériennes : céréales, cultures légumières, fraisiers, fruitiers Traitement de semences : betteraves	Approuvée 31/05/2025	Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP10; 2017)
Pydiflumétofen	1228284-64-7	N-methoxy-(phenylethyl)-pyrazole-carboxamide			Demande d'approbation en cours	Carc. 2 - H351 Repr. 2 - H361f Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 1 - H410 (ATP17 ; 2021)
Sédaxane	874967-67-6	Pyrazole-4-carboxamide		Traitement de semences : céréales, betteraves et maïs	Approuvée 31/05/2025	Carc. 2 - H351 Aquatic Acute 1 - H400 Aquatic Chronic 2 - H411 (ATP17 ; 2021)

3.2 Données de vente

La Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques de 2006 a institué l'obligation pour les distributeurs de produits phytosanitaires de déclarer leurs ventes annuelles de produits phytosanitaires (PPP). Cette déclaration doit permettre de suivre les ventes sur le territoire national (objectif de « traçabilité des ventes ») pour mieux évaluer et gérer le risque « pesticide » mais aussi d'établir le montant de la redevance pour pollutions diffuses (RPD) pour chacun de ces distributeurs. Les données des ventes de PPP se basent sur les déclarations enregistrées depuis 2009. Elles concernent des ventes réalisées par des distributeurs établis en France ou des achats effectués auprès de distributeurs établis à l'étranger. Ces données sont stockées dans la banque nationale des ventes de produits phytosanitaires (BNV-D)¹¹. Les données saisies par les distributeurs en quantités de produits vendus sont ensuite transformées en quantités de SA grâce à un référentiel de données fournissant la composition de produits.

Les données présentées ci-après concernent les ventes déclarées de PPP contenant des substances actives SDHI sur la période 2008-2020 en France (Tableau 2, Figure 3, Figure 4 [extraction des données réalisée le 24/06/22]).

¹¹ <https://ventes-produits-phytopharmaceutiques.eaufrance.fr>

Tableau 2 : Ventes en France en quantité de SA (kg)

Substance	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Benzovindiflupyr	-	-	-	-	-	-	-	-	777	35926	66231	37009	56102
Bixafen	-	-	-	665	47272	82582	86886	93116	91506	78378	96351	65978	70525
Boscalid	523343	600214	582355	570191	420984	390303	364992	277965	259029	200844	230029	101190	75392
Carboxin	15479	28015	48915	54436	76423	57165	55152	51675	43818	44276	41390	15077	417
Flutolanil	7300	13055	12108	12747	10439	9191	4792	3736	4642	5568	8366	5244	12876
Fluopyram	-	-	-	-	-	3	9866	53482	61548	106738	185057	118959	141873
Fluxapyroxad	-	-	-	1543	58127	113752	136513	142273	146848	130726	160417	95696	100046
Isofetamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	176	9168	9718
Penthiopyrad	-	-	-	-	-	-	-	0,4	433	161	47	3	-
Sedaxane	-	-	-	-	3804	13012	24789	21191	21080	25664	38026	41347	50286

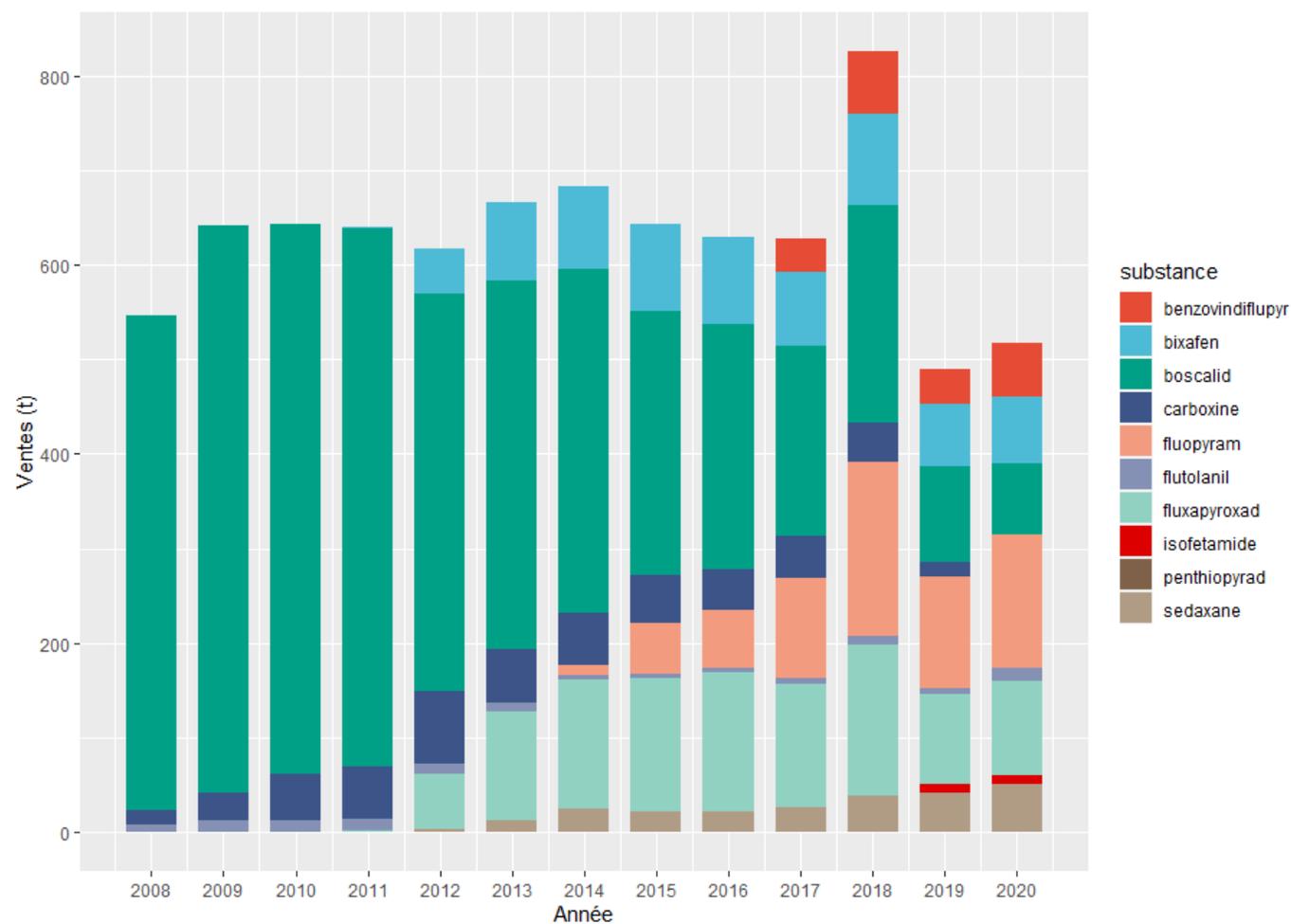


Figure 3 : Ventes de SDHI entre 2008 et 2020 en France en tonnage de SA par an

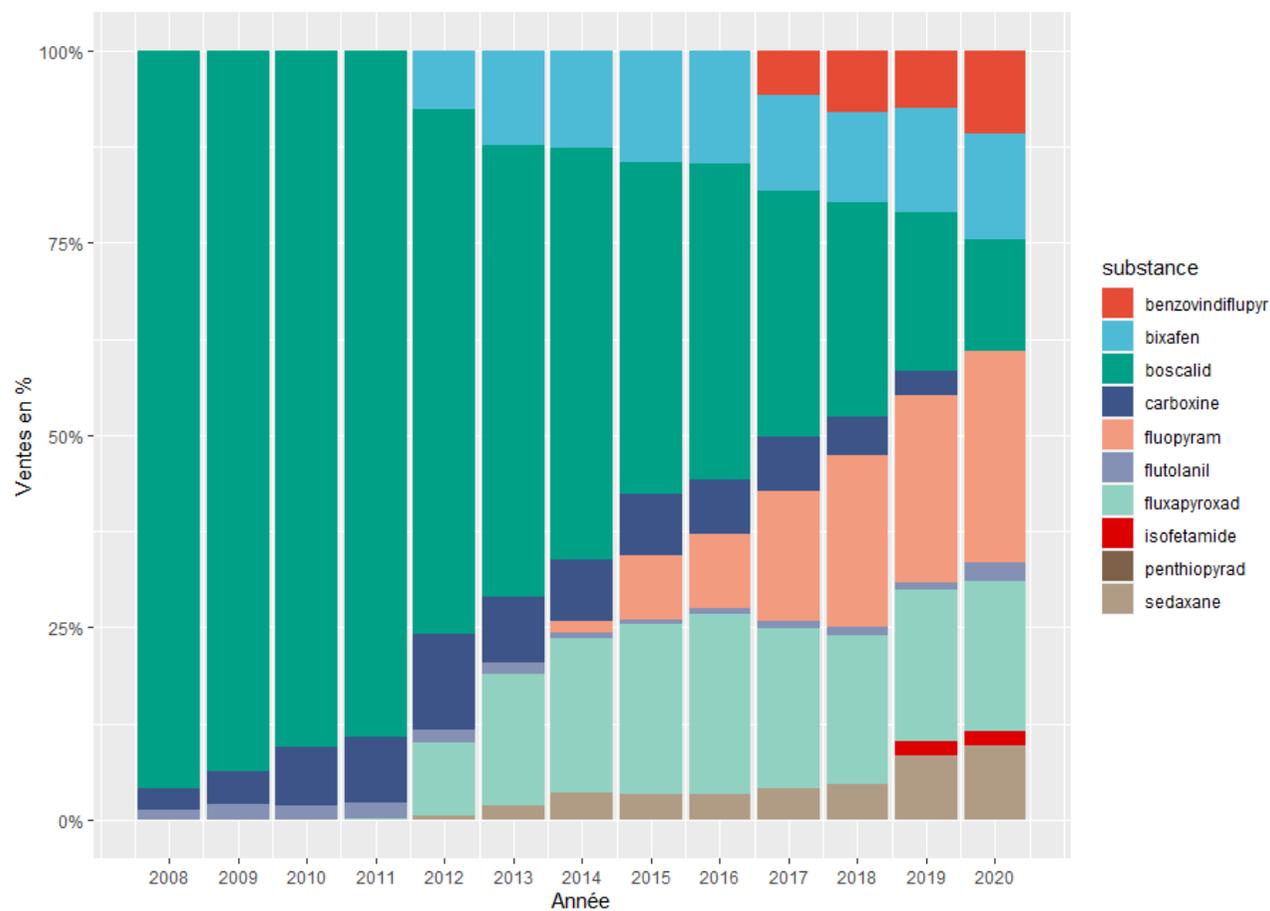


Figure 4 : Ventes de SDHI entre 2008 et 2020 en France en % (en masse) de SA par an

La quantité totale de SA SDHI vendues ne montre pas de tendance particulière sur l'ensemble de la période 2008-2020 avec un volume global entre 500 et 700 tonnes/an (Figure 3 et Figure 4). Le pic observé en 2018 (plus de 800 tonnes), suivi d'une baisse en 2019, s'explique notamment par les achats anticipés fin 2018 dans la perspective de l'augmentation de la redevance pour pollution diffuse en 2019.

L'évolution des ventes montre, par contre, une plus grande diversité de SA SDHI sur le marché. Une diminution constante des ventes de boscalid est observée, avec un pic à 600 tonnes vendues en 2009 jusqu'à 75 tonnes en 2020. Alors que le boscalid constituait plus de 95% des ventes en 2008, il ne représente plus de 15% des ventes de fongicides SDHI en 2020.

Les ventes des SA apparues plus récemment sur le marché, en particulier le bixafen, le fluopyram, le fluxapyroxad, le sedaxane et plus récemment le benzovindiflupyr, sont en augmentation.

Le fluopyram est depuis 2019 la substance la plus vendue en tonnage (142 tonnes en 2020, soit 27% de l'ensemble des SA SDHI), suivie du fluxapyroxad en légère baisse en 2019-2020 (100 tonnes en 2020, soit 19% des ventes).

Les ventes de bixafen qui ont atteint plus de 90 tonnes/an entre 2015 et 2018 sont en légère baisse (70 tonnes en 2020, soit 14% des ventes).

Les ventes de sedaxane, approuvé en 2012, sont en augmentation (50 tonnes en 2020) comme les ventes de benzovindiflupyr, approuvé depuis 2016 (56 tonnes en 2020).

Les ventes de flutolanil, qui ont vu un premier pic avec près de 13 tonnes vendues en 2011, suivi d'une baisse des ventes dans les années suivantes, ont retrouvé ce niveau en 2020.

Les ventes d'isofetamid, approuvé en 2018, atteignent près de 10 tonnes en 2020.

Le penthiopyrad, approuvé en 2015 avec un maximum de vente de 433 kg en 2016, n'est plus vendu en 2020.

Suite à sa non-réapprobation, la carboxine, dont les ventes ont atteint 76 tonnes en 2012 (soit 12% des ventes totales), n'est plus présente sur le marché français.

Il n'est pas enregistré de donnée de vente dans la BNV-D pour le cyflumetofen, l'isopyrazam, le penflufen et le pydiflumetofen (dont le processus d'approbation est en cours).

4 Biochimie de la SDH

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des hématies. Elles assurent la production d'énergie sous la forme d'ATP par le processus de phosphorylation oxydative. Elles jouent ainsi un rôle prépondérant dans le fonctionnement des organes à forte demande énergétique, tels que le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les reins, le foie, etc... La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne, est le siège de la phosphorylation oxydative (

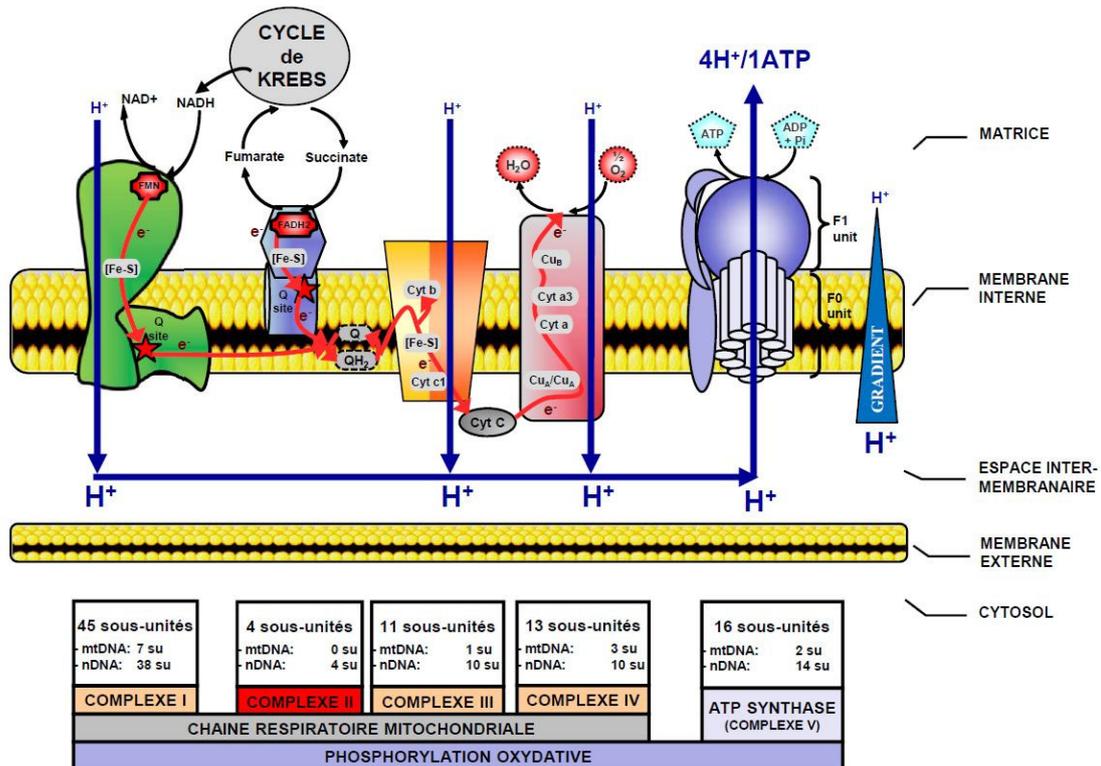


Figure 5). Cette voie métabolique met en jeu cinq complexes enzymatiques hétéro-multimériques (Complexes I à V). Les 90 sous-unités protéiques constitutives de ces cinq complexes sont codées à la fois par le génome nucléaire (n=76) et par le génome

mitochondrial

(n

=

13)

(

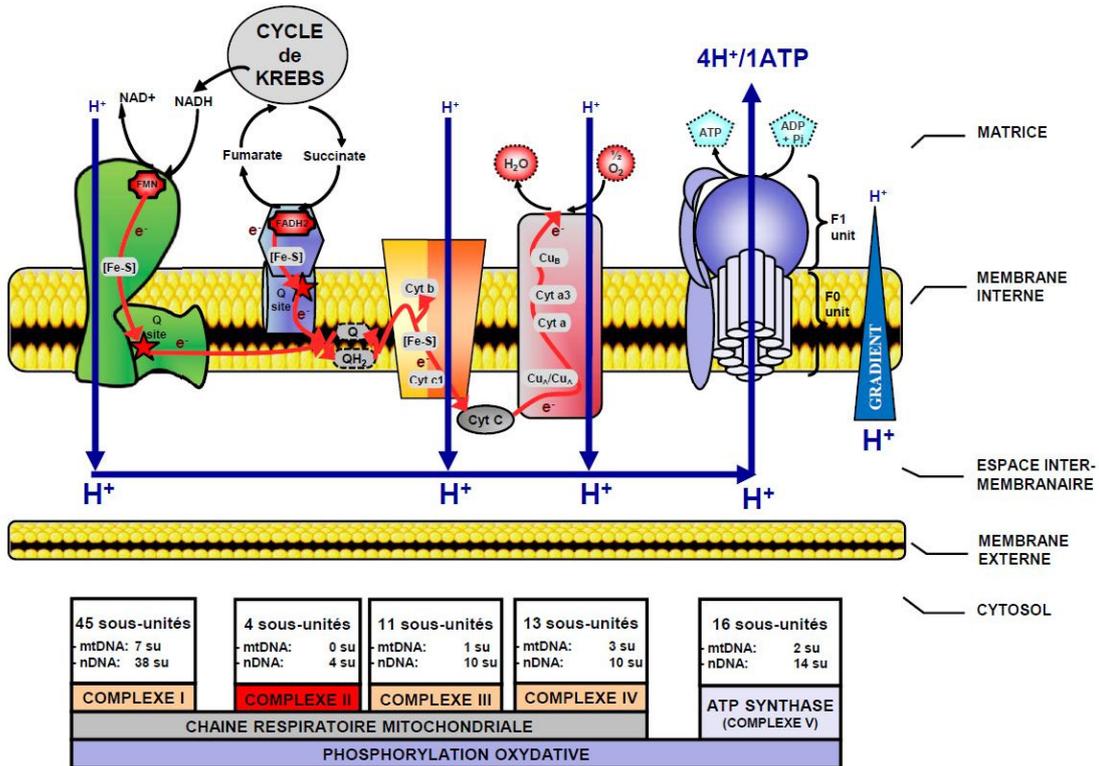


Figure 5). De plus, l'activité de la chaîne respiratoire met également en jeu un grand nombre de coenzymes et de protéines auxiliaires intervenant dans l'assemblage, l'ancrage ou la régulation des complexes I à V.

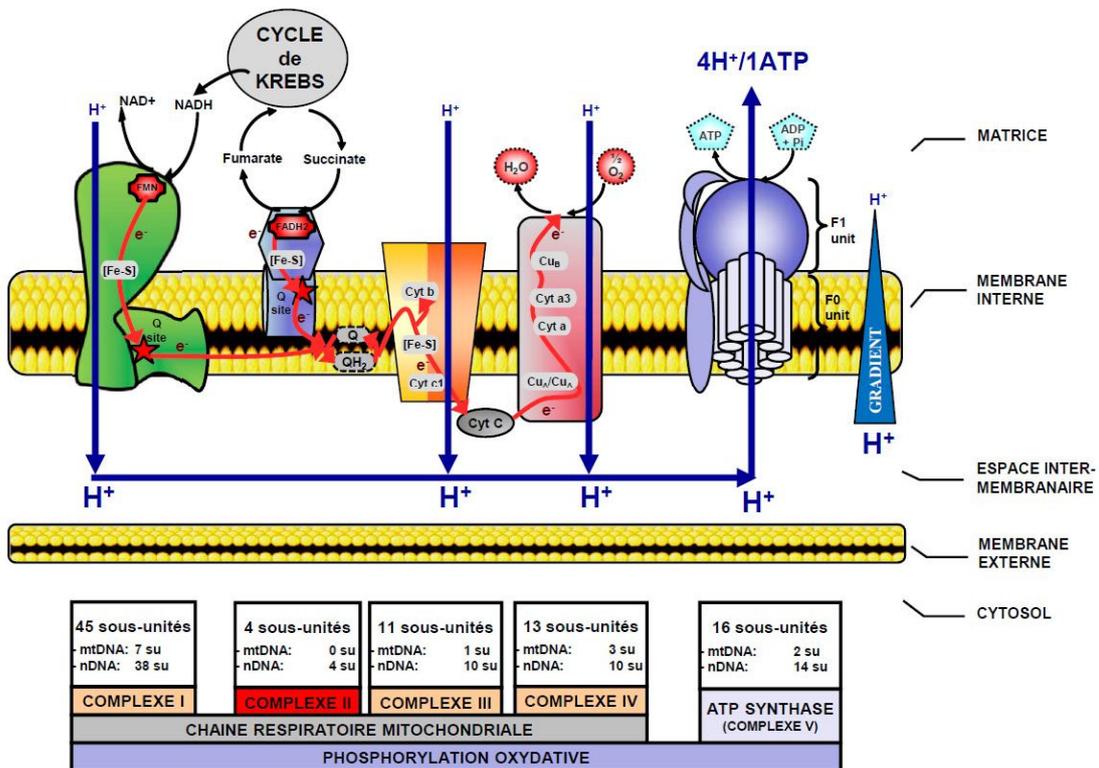


Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale et phosphorylation oxydative, adapté de (Lemarie et Grimm 2011)

Les complexes I et II assurent respectivement l'oxydation des cofacteurs NADH et FADH₂. Au sein de la membrane interne mitochondriale, les électrons provenant de l'oxydation de ces cofacteurs par les complexes I et II sont pris en charge par l'ubiquinone (UQ) et sont ainsi dirigés vers le complexe III. Ce complexe transfère les électrons un à un au complexe IV *via* le cytochrome c. Enfin, le complexe IV transfère les électrons sur leur accepteur final, l'oxygène, pour former de l'eau. L'énergie libérée par le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est utilisée pour le pompage de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire mitochondrial, créant ainsi de part et d'autre de la membrane interne un gradient de protons $\Delta\Psi_m$ possédant un potentiel électrochimique très élevé (150 à 200 mV). Ce gradient de protons est dissipé par l'activité du complexe V de la chaîne respiratoire, capable de laisser rentrer les protons dans la matrice mitochondriale. L'énergie ainsi récupérée est utilisée par ce complexe pour former de l'ATP à partir d'ADP, avec un rendement énergétique très élevé. De façon caractéristique, l'activité des cinq complexes de la chaîne respiratoire, qui permet ainsi d'associer le transfert d'électrons issus du NADH et du FADH₂ à la phosphorylation de l'ADP en ATP, est étroitement coordonnée, d'où la dénomination de phosphorylation oxydative (*oxidative phosphorylation* ou OXPHOS). Le rendement des mécanismes d'OXPHOS est considérablement plus élevé que celui des mécanismes non mitochondriaux de production d'ATP (par exemple, 34 ATP produits par molécule de glucose oxydé contre 2 seulement si le glucose est métabolisé par la glycolyse anaérobie) (Frédéric Bouillaud, Hammad, et Schwartz 2021). En plus de ces fonctions bien connues de production d'ATP, les mitochondries jouent un rôle important dans d'autres aspects du fonctionnement cellulaire, en contribuant notamment au contrôle de l'apoptose, du stress oxydant, de la signalisation calcique intracellulaire et à de nombreuses voies de biosynthèse (protéines Fer-Soufre, hème, cardiolipines, néoglucogénèse, hormones stéroïdiennes, vitamine D,...), ainsi qu'aux mécanismes de signalisation dépendants du Ca⁺⁺ ou des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS).

Cette expertise relative aux SDHI se focalise sur le complexe II et sur les fonctions de la succinate déshydrogénase (SDH).

4.1 Fonctionnement de la SDH

Les SA SDHI sont des substances inhibitrices de l'activité SDH ou complexe II mitochondrial. La SDH catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Cette réaction fait partie du métabolisme oxydatif des substrats carbonés et la SDH est présente dans l'ensemble du monde vivant, des bactéries aux mammifères et plantes supérieures.

Cette activité impliquée dans le fonctionnement métabolique basal des cellules repose sur une conservation inter-espèces de la structure du complexe SDH, analysé en comparaison de séquences nucléotidiques de sites spécifiques et par diffraction des rayons X.

La réaction enzymatique catalysée par la SDH fait partie d'une série de réactions désignées par les termes de cycle de Krebs ou de cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Le cycle de Krebs est surtout connu pour son rôle dans l'oxydation terminale des substrats carbonés avec libération de CO₂. L'oxydation complète du glucose produit six CO₂, quatre provenant des réactions du cycle de Krebs. Si l'on considère l'oxydation des acides gras, la totalité du CO₂ libéré provient du cycle de Krebs.

Les deux électrons obtenus par la réaction d'oxydation sont cédés par la SDH au coenzyme Q (quinone) de la chaîne respiratoire mitochondriale. La SDH est donc aussi connue sous le nom de complexe II de cette chaîne respiratoire, ou encore succinate coenzyme Q oxydoréductase. Les réactions impliquent aussi deux protons, d'où le terme de déshydrogénase.

La SDH est un complexe enzymatique composé de quatre sous unités (SDHA à SDHD) dont la structure atomique a été déterminée par cristallographie, notamment chez le porc (Sun et al. 2005).

La réaction d'oxydo-réduction catalysée par la SDH nécessite la présence de coenzymes (FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), hème) et de groupes Fer-Soufre (FeS) (Figure 6). Dans cette organisation moléculaire, on reconnaît alors deux pôles : SDHA qui catalyse la réaction SDH impliquant un groupe FAD, et SDHC/SDHD qui réduisent la quinone (Q), réaction qui impliquerait potentiellement un transfert d'électrons au groupe hème. Entre ces deux pôles, la sous-unité SDHB assure la transmission des électrons de la réaction SDHA vers SDHC/D grâce aux groupes FeS et ainsi permet la réduction de la quinone.

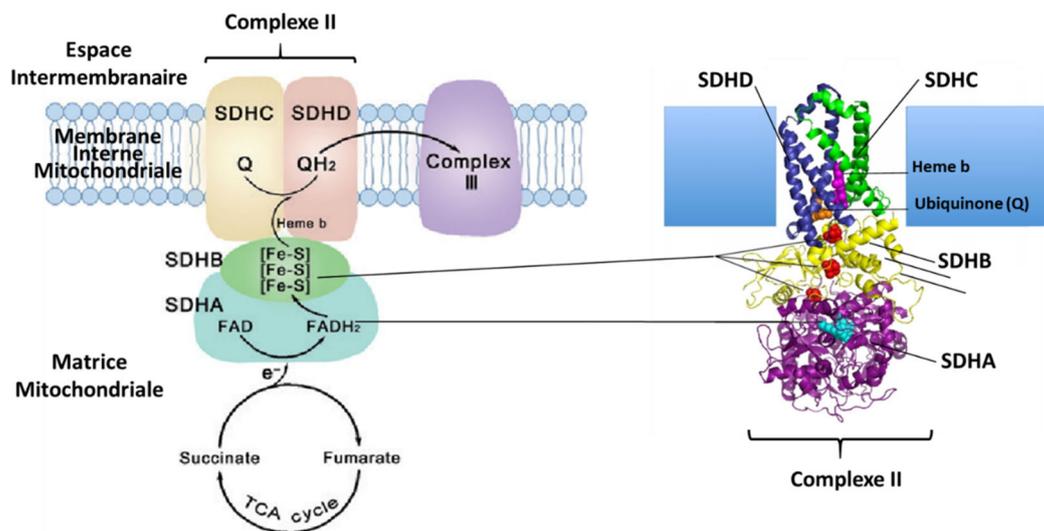


Figure 6 : Structure de la SDH (adapté de (Moosavi et al. 2020; Her et Maher 2015))

A cette division fonctionnelle s'ajoutent des caractéristiques topologiques et physicochimiques. SDHA et SDHB constituent un domaine hydrophile qui fait saillie dans le compartiment interne de la mitochondrie (matrice) où est localisé l'ensemble des enzymes du cycle de Krebs. A l'opposé, SDHC et SDHD constituent un domaine hydrophobe inséré dans la membrane interne, ce qui est aussi le cas de tous les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à IV) et du complexe V (ATP synthase), couplé à cette chaîne. Ce contraste se reflète dans la nature des substrats et produits de la réaction SDH. En effet, le substrat succinate et le produit fumarate sont des diacides organiques à quatre carbones donc de petites molécules solubles en milieu aqueux. L'accepteur d'électrons, le coenzyme Q, est une quinone hydrophobe de haut poids moléculaire, insoluble en milieu aqueux et confinée dans la phase lipidique de la membrane mitochondriale interne.

Enfin, l'étude de l'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire a révélé la présence de respirasome ou supercomplexes, qui rassemblent les complexes I, III et IV. Seul le complexe II (SDH) n'appartient pas au respirasome. Le complexe II est codé par des gènes uniquement localisés dans le génome nucléaire, alors que les autres complexes I, III, IV et V contiennent des sous-unités codées à la fois par l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire. Ces caractéristiques permettent de considérer la SDH comme un complexe enzymatique différent des autres complexes de la chaîne respiratoire.

La préparation du complexe II isolé a montré que le lien entre domaine hydrophile et domaine hydrophobe peut être assez facilement rompu et que les domaines SDH et complexe II séparés conservent leurs propriétés d'oxydo-réduction mais nécessitent l'un et l'autre soit un accepteur d'électrons (réaction SDHA) soit un donneur d'électrons (réaction SDHC-D) d'une autre nature (Figure 7).

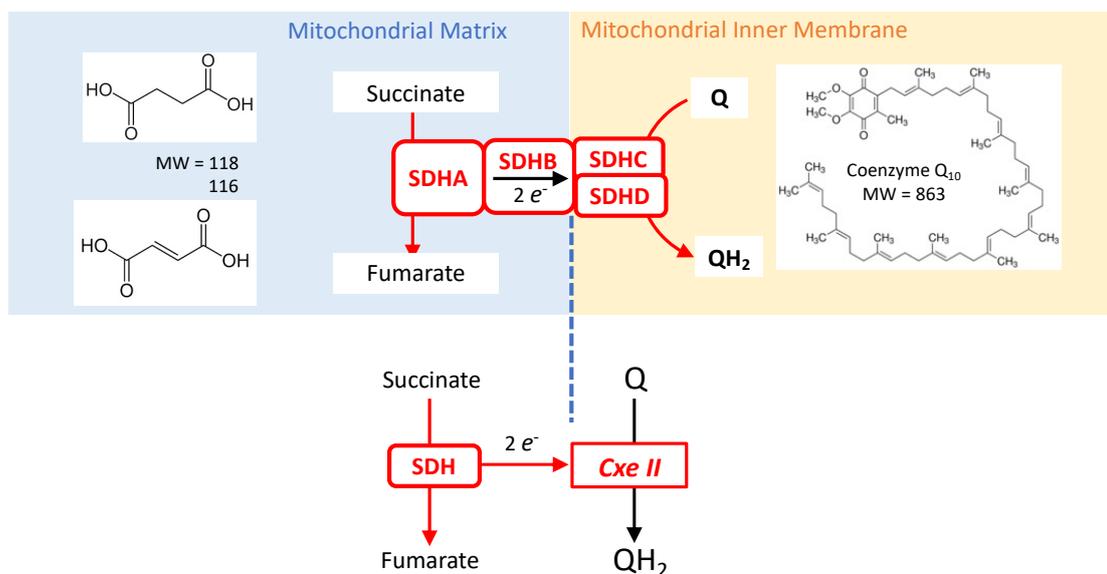


Figure 7: Substrats, topologie de la SDH/complexe II (Frederic Bouillaud 2023)

Comme de nombreuses réactions enzymatiques, la SDH peut fonctionner dans les deux sens, le sens réverse voit donc la réduction du fumarate en succinate avec oxydation du coenzyme Q (Figure 8). Cette inversion aurait lieu lors d'une adaptation à des conditions hypoxiques/anaérobiques (Goldberg, Passonneau, et Lowry 1966; Hochachka et Mustafa 1972), d'intoxication mitochondriale (Goubert et al. 2007) et lors de l'ischémie (Chouchani et al. 2014). Cependant cette inversion tend à être considérée comme une composante normale du métabolisme (Baksh et Finley 2021).



Figure 8: Les deux sens de la réaction SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

Il faut ainsi considérer le site d'action d'un inhibiteur de la SDH (sous-unité A-D) et le contexte métabolique et REDOX pour comprendre le mécanisme d'action des SDHI ainsi que leur mécanisme de toxicité.

4.2 SDH : aspects métaboliques (cycle de Krebs) et respiratoires (complexe II)

Il est possible de séparer les aspects métaboliques avec les voies d'oxydation du carbone en CO_2 (donc le cycle de Krebs) et la respiration « *stricto sensu* » au sens de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le lien entre les deux est constitué par le transfert des électrons (venant de l'oxydation en CO_2) à la chaîne respiratoire qui les achemine vers l'oxygène moléculaire O_2 avec libération d'eau (Figure 9). La finalité de ces réactions est l'obtention d'énergie sous une forme utilisable par la cellule, c'est-à-dire la formation d'une liaison phosphate « à haute énergie » par phosphorylation de l'ADP en ATP *via* l'ATP synthase

(Complexe V). Les réactions du métabolisme ont lieu dans le cytoplasme ou le compartiment interne des mitochondries (matrice) et donc en milieu hydrophile (aqueux). A l'opposé, l'OXPHOS repose sur les complexes membranaires (complexes I-V de la chaîne des OXPHOS)

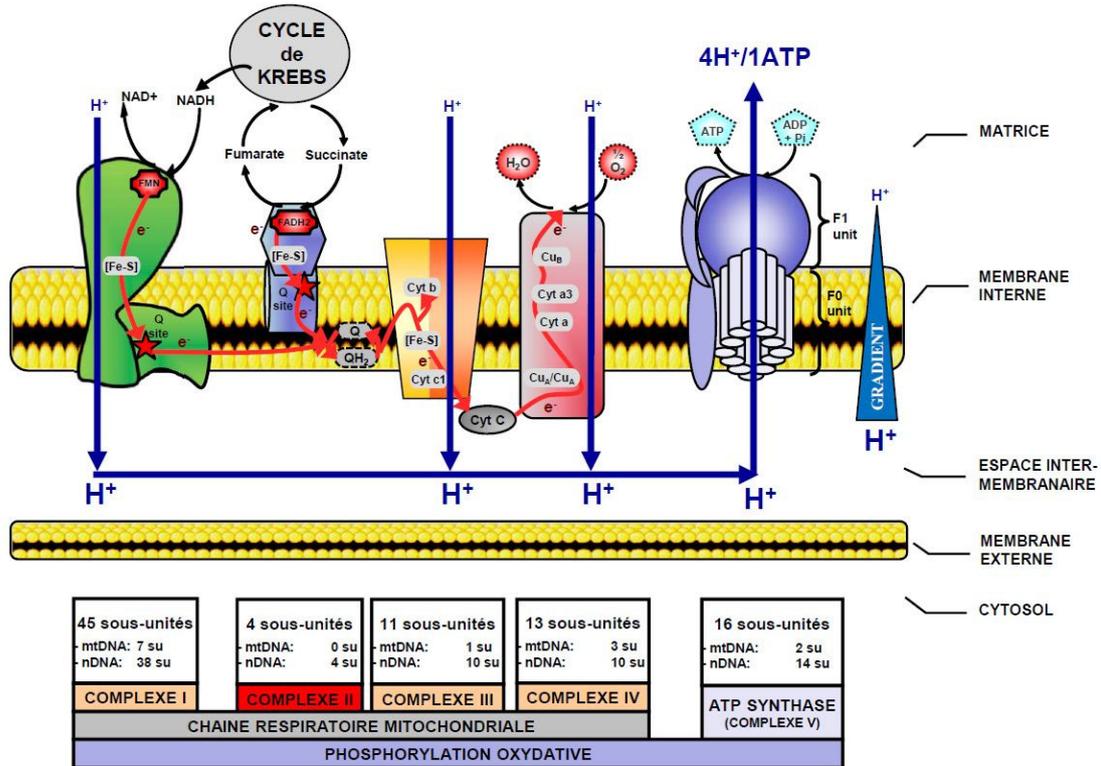


Figure 5).

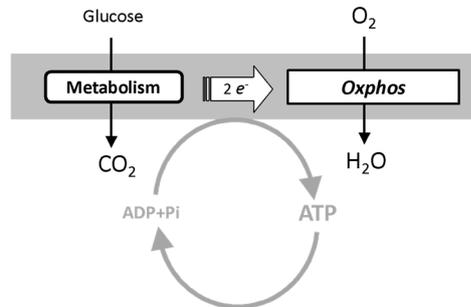


Figure 9: Bioénergétique cellulaire, cycle de l'ATP, métabolisme et phosphorylation oxydative (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

A la formation d'ATP près, la réaction SDH se superpose à ce schéma général : SDHA participe au métabolisme et SDHC-D à l'OXPHOS, ce qui fait de la SDH un cas particulier. En effet, dans la majorité des cas, une activité enzymatique donnée appartient à l'un de ces deux blocs fonctionnels, et le transfert d'électrons entre les deux se fait par l'intermédiaire d'un transporteur d'électrons mobile (le nicotinamide adénine dinucléotide ou NADH) et non par une sous unité enzymatique comme c'est le cas de la sous-unité B de la SDH. Une description du métabolisme du glucose illustre cette particularité (Figure 10).

La réaction SDH est nécessaire à l'oxydation complète du glucose, et donc à la génération de dix NADH, mais en comparaison du complexe I, la réaction du complexe II est un contributeur minoritaire dans la chaîne OXPHOS.

Si l'on considère le cycle de Krebs dans son ensemble, une première séquence commence avec la condensation de l'acétyl-CoA sur l'oxaloacétate, pour former le citrate, et se termine avec la formation de succinate. Cette suite de réactions peut être considérée comme irréversible car les deux étapes de libération de CO₂ produisent beaucoup d'énergie et donc les réactions inverses sont très improbables. A l'opposé, la deuxième partie est réversible, et dans ce cas, la SDH ne consomme plus le succinate mais en produit (Figure 11).

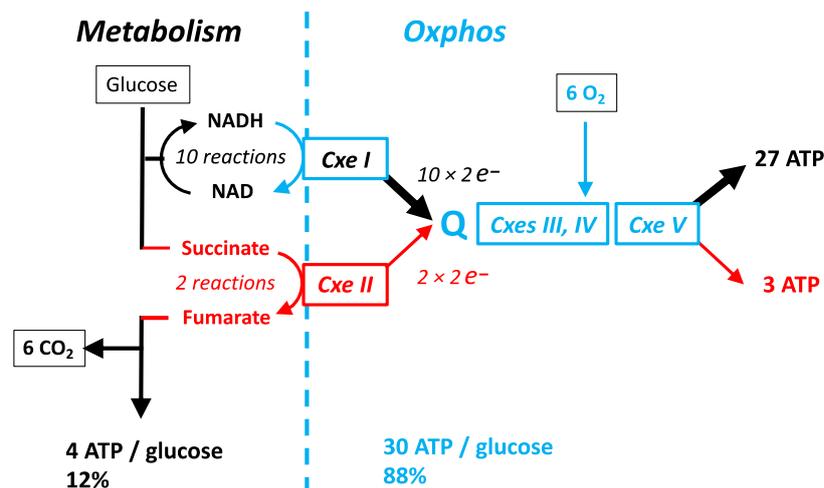


Figure 10 : Oxydation du glucose, voie métabolique et intervention des complexes I à V de la phosphorylation oxydative (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

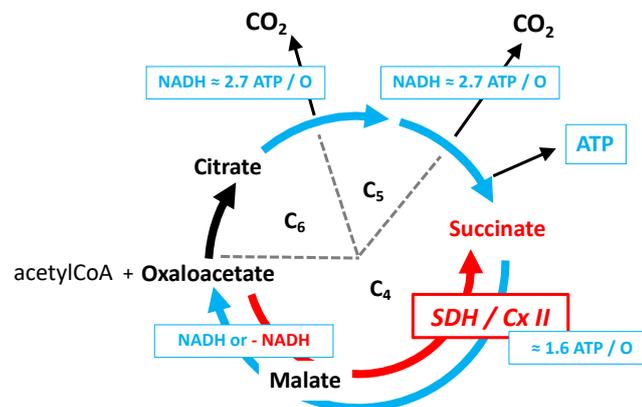


Figure 11: Cycle de Krebs (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

Le rôle de cette inversion est établi *in vivo*. Elle représente une adaptation à des conditions anoxiques. En effet, elle rend possible un fonctionnement « bioénergétique » où l'accepteur final d'électrons est la formation de succinate et non plus de l'eau. En fait, la situation est fonctionnellement comparable à la fermentation lactique, et de la même façon le succinate accumulé devient une dette d'oxygène qui sera remboursée plus tard/ailleurs par des réactions SDH en sens normal. Les exemples les plus connus sont ceux des situations transitoires/pathologiques d'hypoxie (Chouchani et al. 2014) ou bien les adaptations

spécifiques observées chez des organismes adaptés à une vie en anaérobie permanente ou épisodique, adaptations connues en fait depuis des décennies (Goldberg, Passonneau, et Lowry 1966; Hochachka et Mustafa 1972).

Cependant, il est admis qu'il existe chez les mammifères des « symbioses fonctionnelles » entre cellules productrices de lactate (ex. les hématies, les astrocytes ou les cellules musculaires...), et des cellules consommatrices (ex. les hépatocytes, les neurones...). La même situation semble exister entre les cellules productrices et consommatrices de succinate dans la rétine (Bisbach et al. 2020), mais aussi probablement dans d'autres organes (Spinelli et al. 2021; Baksh et Finley 2021).

Une contrainte est que ces réactions symétriques de la SDH peuvent devenir dépendantes d'une activité intense de la SDH en comparaison de celle liée à un fonctionnement normal du cycle de Krebs et l'oxydation en CO₂. Elles peuvent donc être entravées par des concentrations d'inhibiteur sans conséquence sur le métabolisme oxydatif « normal » (cf. section 4.3.3).

Des modifications post-traductionnelles des sous-unités jouent un rôle dans l'adaptation métabolique (Bezawork-Geleta et al. 2017). La phosphorylation de SDHA augmente la respiration dépendante du complexe II. La déacétylation de SDHA augmente l'entrée du substrat au site actif. La succinylation de SDHA et SDHB est associée à une augmentation d'activité du complexe II. D'autres réactions de modifications post-traductionnelles des sous-unités (O-GlcN-acylation, S-nitrosylation, lysine malonylation, lysine glutarylation, ADP-ribosylation) sont supposées jouer un rôle dans l'activité et la fonction mitochondriale (Stram et Payne 2016).

4.3 Inhibition de la SDH

Il existe deux mécanismes à l'origine d'un dysfonctionnement de la SDH : d'une part des mutations dans l'un des gènes SDHx (cf. section 7) et d'autre part, l'effet inhibiteur par des xénobiotiques. Ces inhibiteurs de la SDH peuvent être divisés en deux types qui correspondent à la dualité fonctionnelle de la SDH (cycle de Krebs et respiration), ce qui est bien confirmé par les données de cristallographie (Sun et al. 2005).

Certains sont des acides organiques dont toutes les propriétés physicochimiques, tels que le poids moléculaire, la charge, la structure et la solubilité, les rapprochent des substrats naturels de la réaction SDH (succinate, fumarate). L'oxaloacétate, et dans une moindre mesure, le malate, apparaissent comme des inhibiteurs physiologiques de l'activité de l'enzyme. Il existe deux inhibiteurs pharmacologiques : le malonate, inhibiteur compétitif du succinate, et l'acide 3-nitropropionique (3-NP) dont l'action est irréversible.

Les autres inhibiteurs sont des molécules de plus grande taille, plutôt hydrophobes, qui se lient à la poche de l'ubiquinone tel que le TTFA (2-thenoyltrifluoroacétone). Sur la base de ces propriétés, les pesticides SDHI, sont tous de la deuxième catégorie (Figure 12).

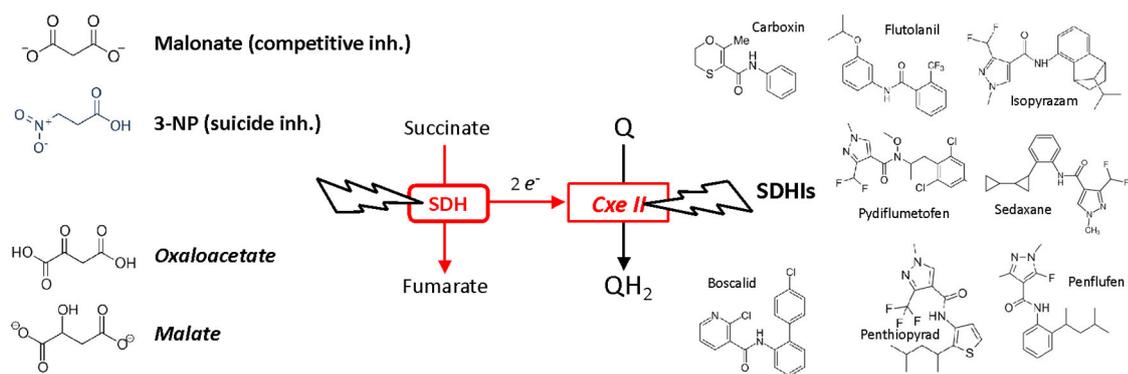


Figure 12: Inhibiteurs de SDH hydrophiles (listés à gauche) et inhibiteurs de SDH de type 'SDHI' hydrophobes (listés à droite) (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

La mesure de l'activité SDH

L'évaluation de l'activité SDH repose sur une réaction complète depuis le succinate jusqu'à la quinone, l'accepteur final étant la décylubiquinone ajoutée dans le milieu réactionnel (Figure 13). L'inhibition de la réaction par le malonate est une indication de spécificité de la réaction.

Le premier isolement de la SDH ne contenait pas les sous-unités membranaires (SDHC et SDHD) mais plus tard, l'enzyme complète a pu être reconstituée en reliant deux préparations enzymatiques distinctes (Baginsky et Hatefi 1969), avec comme conséquence la mise en évidence de 2 activités distinctes, l'activité SDH (oxydation du succinate en fumarate) et l'activité du complexe II (transfert d'électrons). Cette enzyme amputée (SDHA et SDHB) pouvait néanmoins oxyder le succinate et réduire des réactifs comme le phénazine methosulfate (PMS) ou des sels de tétrazolium (Baker et Santer 1990) (Figure 13). Le bleu nitré tétrazolium (NBT) est utilisé pour la détection histochimique de la SDH sur coupe de tissus (Brouillet et al. 1998). L'effet inhibiteur du 3-NP a été observé selon cette technique. Ce même NBT est aussi à la base du test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) de viabilité cellulaire.

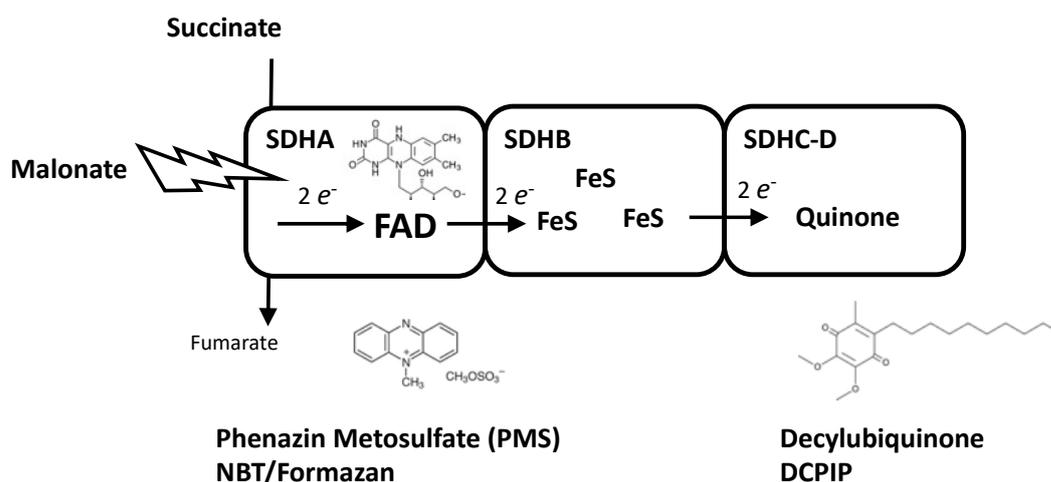


Figure 13 : Accepteurs d'électrons pour différentes méthodes de dosage de la SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

L'effet inhibiteur direct d'un SDHI serait donc indétectable avec le PMS ou des sels de tétrazolium puisque leur réduction ne dépend pas des sous unités C et D impliquées dans la réduction de la quinone. Ceci est appuyé par des études *in vitro* utilisant le TTFA, inhibiteur se liant au site du coenzymeQ, qui ne parvient pas à inhiber cette activité liée au transfert d'électrons au PMS, mais seulement la réaction complète transférant les électrons du succinate à la décylubiquinone (Lemarie et Grimm 2011).

A la différence des inhibiteurs non-pesticides, l'inhibition par un SDHI pourrait conduire à la persistance d'un flux résiduel d'oxydation du succinate sans transfert des électrons vers la chaîne respiratoire avec pour conséquence, la production de ROS par la SDH comme une issue possible. Ainsi, des études ont montré que des inhibiteurs non pesticides de la SDH et ciblant le site quinone génèrent de notables quantités de ROS (superoxydes), à la différence des inhibiteurs non pesticides de type 3-NP qui n'entraînent que peu ou pas de production de ROS (Lemarie et Grimm 2011).

4.3.1 Inhibiteurs hydrophiles non pesticides : malonate et 3-NP

Les inhibiteurs hydrophiles, malonate et 3-NP, ont été utilisés chez l'animal pour déclencher des événements reproduisant les pathologies liées à une atteinte du striatum ou à l'opposé, pour inhiber la SDH dans des modèles d'ischémie, avec pour but d'investiguer le bénéfice d'une inhibition de la SDH lors de la phase de reperfusion tissulaire (Chouchani et al. 2014).

4.3.2 SDHI et autres inhibiteurs du site du coenzyme Q

Les pesticides SDHI se lient fortement au site de liaison de l'ubiquinone, constitué par les sous-unités SDHB, SDHC et SDHD (Sierotzki et Scalliet 2013) (Figure 6). Comme la quinone, ce sont, pour la plupart, des molécules hydrophobes d'environ 400 Daltons.

Des inhibiteurs non-pesticides de la SDH ciblant spécifiquement le site de liaison au coenzyme Q existent et ont été largement utilisés pour bloquer le complexe II dans de nombreux modèles cellulaires. Parmi eux, le TTFA ou l'atpénine A5, peuvent potentiellement mimer le mode d'action des SDHI pesticides et leurs conséquences.

Le plus ancien pesticide SDHI mis sur le marché est la carboxine. L'effet de cette molécule sur la SDH de mammifères a été étudié et publié (Mowery et al. 1976; 1977; Coles et Singer 1978). La carboxine se caractérise par une affinité élevée pour le site de liaison au coenzyme Q de la SDH. Cette affinité des SDHI pour la cible SDH a été démontrée dans une étude plus récente (Bénit et al. 2019) présentant les concentrations d'inhibition à 50% (IC50) pour huit des quatorze molécules examinées par le GT et trois SDH animales (humain, lombric, abeille). Avec la SDH humaine, pour six des huit molécules (bixafen, isopyrazam, penflufen, fluxapyroxad, penthiopyrad, boscalid), l'IC50 était inférieure à 5 µM, des valeurs plus élevées ont été observées pour le flutolanil (18,7 µM) et le fluopyram (160 µM). Une autre étude portant sur le cyflumetofen et son métabolite actif AB-1 a également démontré une inhibition par ce dernier de l'activité du complexe II dans des mitochondries isolées d'acariens cibles, d'insectes, dont l'abeille, de crustacés (*daphnia magna*) et de rongeurs (rat et souris) (Hayashi, 2013). Les IC50 pour les abeilles et les crustacés sont de l'ordre de 0,2 µM pour le métabolite AB-1 et supérieures à 10 µM pour le composé parent.

L'inhibition de la SDH par la carboxine est réversible (Coles et Singer 1978). L'effet inhibiteur du bixafen est diminué *in vitro* en présence de quinone (Bénit et al. 2019). Il n'y a pas de données sur la nature compétitive ou réversible de l'inhibition pour les autres SDHI.

4.3.3 Conséquences métaboliques d'une inhibition de la SDH

En présence d'une inhibition croissante de la SDH, trois situations, avec des conséquences différentes, peuvent être prédites (Figure 14).

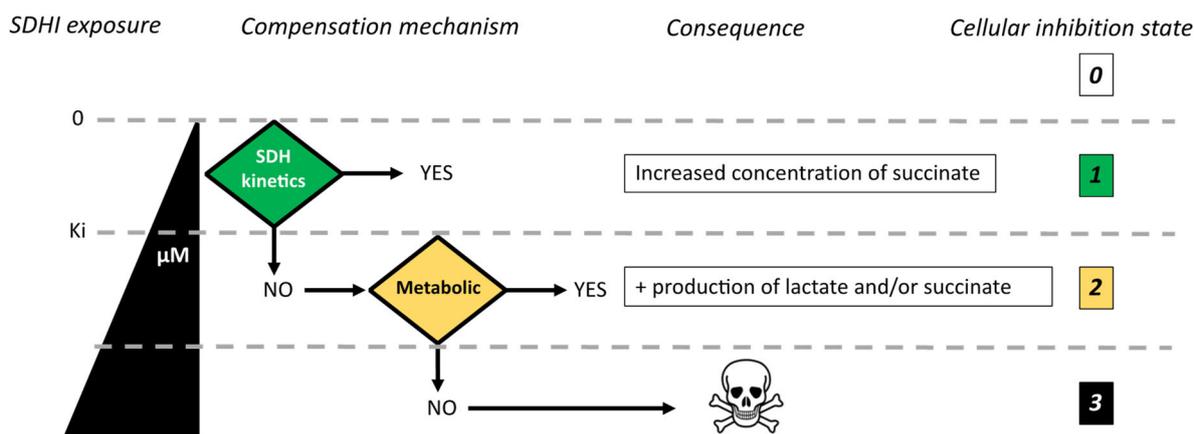


Figure 14: Niveaux d'inhibition de la SDH et conséquences (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

La compensation cinétique (niveau 1) débute avec la possibilité d'un contact entre un SDHI et la SDH. La SDH a une affinité assez faible pour le succinate, de l'ordre du mM, avec par exemple une valeur de 0,5 mM en histochimie (Brouillet et al. 1998) et son activité maximale apparaît très supérieure à celle requise (Medja et al. 2009). L'activité enzymatique de la SDH augmente beaucoup avec la concentration en succinate et les concentrations utilisées pour déterminer l'activité de la SDH sont de l'ordre de 10-20 mM (Medja et al. 2009; Doerrier et al. 2018). La compensation cinétique repose uniquement sur une augmentation de la concentration intracellulaire/mitochondriale en succinate qui reste stationnaire à une valeur permettant le rétablissement d'un flux métabolique normal/suffisant à travers la SDH.

La compensation métabolique (niveau 2) intervient si la composante cinétique ne peut suffire. Le cycle de Krebs ne peut donc plus opérer de façon cyclique avec régénération de l'oxaloacétate mais est interrompu avant la SDH. Le flux métabolique est perturbé. La plus évidente des adaptations métaboliques serait une compensation par la fermentation lactique. Cependant, il faut prendre en compte l'existence d'un cycle du succinate permanent (dans la rétine) ou séquentiel (lors de situations d'ischémie/reperfusion). Une accumulation (excrétion) de succinate par les cellules sous inhibition est concevable mais elle rend obligatoire la régénération de l'oxaloacétate qui ne peut venir que de la mobilisation accrue de glucose/pyruvate ou d'acides aminés transformés *in fine* en succinate.

La présence d'un SDHI dans le milieu intracellulaire rend le contact possible avec la SDH. En effet, la membrane externe mitochondriale n'est pas un obstacle, et la nature hydrophobe des SDHI leur confère plutôt un tropisme membranaire. En conséquence, l'interaction des SDHI avec la SDH est possible pouvant induire, à un certain degré d'inhibition, une augmentation de la concentration en succinate.

Avec le niveau 1, une inhibition de la SDH conduit à une modification des concentrations des intermédiaires du TCA, c'est-à-dire une augmentation de la concentration en succinate et composés en amont de la réaction SDH et une diminution des composés aval (Figure 15). Ces modifications conduisent à une lipogénèse accrue, une néoglucogénèse diminuée (intolérance au jeûne). Avec le niveau 2, une compensation métabolique est atteinte avec production de lactate et de succinate.

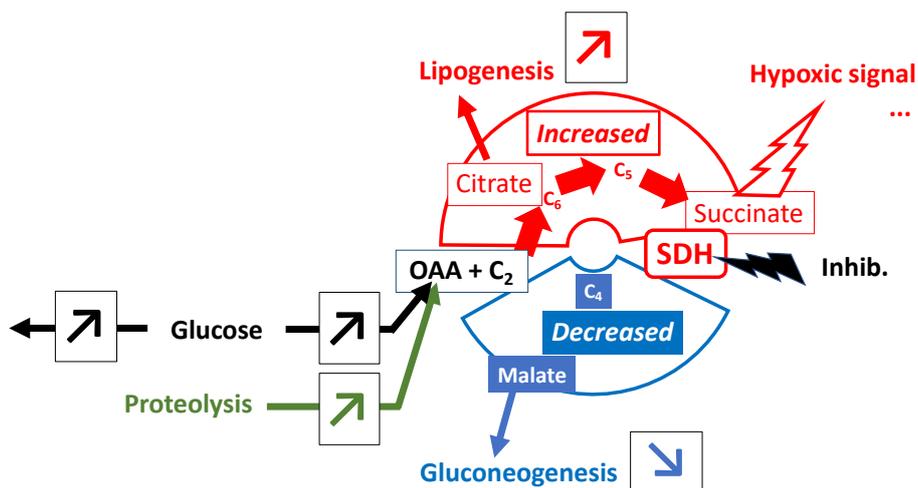


Figure 15 : Conséquences métaboliques de l'inhibition de la SDH (F. Bouillaud, communication personnelle dans le cadre du GT)

Le citrate, précurseur de la lipogénèse, est le composant le plus amont du cycle de Krebs utilisé dans le sens oxydatif, et le malate, précurseur de la néoglucogénèse, l'avant dernier. La transition de l'un vers l'autre est étroitement liée au fonctionnement des enzymes du cycle de Krebs, mais aussi de la chaîne respiratoire (OXPHOS) et donc de tous ses complexes I-V.

Au niveau 3, la compensation métabolique devient insuffisante conduisant à la mort cellulaire.

5 Evaluations antérieures

5.1 Expertise Anses

Dans une tribune publiée le 16 avril 2018 dans la presse, plusieurs scientifiques ont souhaité alerter sur les risques potentiels pour la santé et l'environnement de l'usage en agriculture des fongicides SDHI. Dans ce contexte, l'Anses a confié l'analyse de ce signal à un groupe d'experts. Un avis et un rapport ont été publiés en janvier 2019 ([Anses, 2019](#)).

L'expertise réalisée en 2018 présente des différences avec l'expertise objet du présent avis.

En effet, cette l'expertise de 2018 :

- a été réalisée dans le contexte d'une alerte relativement « large », couvrant tant des questionnements écotoxicologiques qu'en santé humaine, sur un vaste panels d'effets sanitaires potentiels ;
- a été réalisée par un groupe d'expertise collective d'urgence (GECU), dont le format (nombre d'experts) et la durée n'ont pas permis une revue exhaustive de toute la littérature ;
- s'est appuyée sur les connaissance scientifiques du moment, certaines données relatives à l'affinité des SDHI pour les mitochondries de diverses espèces n'ayant alors pas fait l'objet d'une publication revue par les pairs.

En 2018, le GECU a noté qu'il n'était pas possible de répondre de manière définitive à toutes les questions et hypothèses identifiées auprès des chercheurs lanceurs de l'alerte et que :

- certaines questions ou hypothèses renvoyaient à des réflexions communes à toutes les SA phytopharmaceutiques voire à d'autres produits chimiques réglementés ;
- certaines de ces questions ou hypothèses étaient plus spécifiques à la famille des SDHI, parmi lesquelles la sensibilité croisée des enzymes humaines et fongiques, l'introduction d'études ciblées (en sus des études réglementaires minimales) pour considérer les risques mitotoxiques ou encore la pertinence du modèle rongeur pour détecter des cancers imputables à une altération de la fonction SDH.

Cependant, au regard d'éléments considérés comme positifs, au titre desquels :

- le respect des bonnes pratiques agricoles pour cette famille de substances,
- la faiblesse des expositions alimentaires totales rapportées aux seuils toxicologiques alors connus,
- le métabolisme important de ces substances conduisant à des doses internes faibles au regard de l'exposition externe,
- l'état actuel des connaissances scientifiques relatives à la plausibilité d'un effet cancérigène en présence d'inhibition réversible de la SDH et/ou d'accumulation limitée de succinate,
- l'absence de signal d'alerte sanitaire en termes d'effets spécifiques observés pour les organismes de l'environnement, ou d'augmentation de l'incidence des cancers spécifiques associés au déficit en SDH, chez l'humain non porteur de mutation, malgré une commercialisation parfois ancienne de ces molécules,

le GECU a considéré que les informations et hypothèses scientifiques du moment :

- n'apportaient pas d'éléments en faveur d'une exposition qui n'aurait pas été prise en compte dans l'évaluation des SA concernées (termes de la saisine),

- mettaient en évidence des incertitudes résiduelles sur des risques qui auraient pu ne pas être pris en compte dans l'évaluation des SA concernées.

Afin de lever certaines des incertitudes (spécifiques ou non des SDHI), le GECU a préconisé les recommandations résumées ci-après ainsi qu'une ré-évaluation de la sécurité d'emploi des SA SDHI au fur et à mesure de la levée des incertitudes (Tableau 3).

Tableau 3: liste des recommandations issues de l'expertise du GECU (Anses 2019)

Recommandations afin de mieux caractériser les dangers des SA SDHI	Recommandations afin de mieux caractériser les expositions	Recommandations afin de mieux caractériser les risques associés aux SA, dont les SDHI	Recommandations afin de renforcer les dispositifs réglementaires existants
Caractériser les propriétés d'inhibition des SDHI, de leurs métabolites et produits de dégradation, sur des enzymes humaines et des organismes non cibles	Poursuivre les plans de surveillance et de contrôle apportant des informations sur l'exposition de la population et des organismes de l'environnement	Tester la faisabilité d'un suivi rétrospectif et prospectif de l'évolution de l'incidence de pathologies connues en lien avec des mutations « SDH »	Introduire des requis sur la pertinence chez l'humain et les organismes non cibles du mécanisme d'action des SA
Ces propriétés d'inhibition seront mises en regard des expositions estimées	Ajouter d'autres SA SDHI dans les plans de surveillance et de contrôle et les futurs travaux de l'étude de l'alimentation totale (EAT)	Quantifier l'exposition interne des travailleurs et consommateurs exposés	Considérer la possibilité d'identifier des effets toxiques justifiant un principe de précaution équivalent à celui dont bénéficient les substances cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques (CMR)
Développer l'utilisation d'outils utilisables lors des évaluations réglementaires, pour les effets mitotoxiques	Prendre en compte les expositions par voie aérienne lorsque ces données seront disponibles	Poursuivre les travaux de recherche sur le cumul des expositions pour un effet donné	Considérer le recours plus systématique aux tests écotoxicologiques complexes (cosmes)
		Développer l'utilisation ou le recours aux AOP (<i>Adverse Outcome Pathway</i>) ¹² pour considérer les effets combinés des mélanges (Souders et al. 2018)	Considérer la possibilité d'un suivi des matrices non aqueuses (sols) afin de documenter l'imprégnation en SA et métabolites persistants
		Poursuivre les efforts de création, de collecte et d'interprétation des	Poursuivre l'intégration des approches cumulées dans les processus

¹² Séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable in vivo, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire

		données de phytopharmacovigilance	réglementaires d'évaluation
--	--	--------------------------------------	--------------------------------

5.2 Expertise INSERM

L'INSERM a conduit une [expertise collective sur les pesticides et les effets sur la santé \(2021\)](#)(Inserm 2021). Un chapitre a été consacré aux SDHI. La [synthèse de l'expertise collective](#) correspondant au chapitre SDHI est présentée ci-dessous.

« Les fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase ou SDHi constituent une famille de fongicides, dont certains, comme la carboxine et le flutolanil sont utilisés depuis plus de trente ans, et d'autres, tels que ceux de seconde génération depuis une dizaine d'années (boscalide, benzovindiflupyr, isopyrazam, penthiopyrade, sédaxane...). Alors que l'utilisation de la première génération de ces pesticides en France a diminué ces dix dernières années, celle des SDHi de nouvelle génération est en hausse et s'élargit à d'autres spectres d'activité (par exemple pour le traitement contre les nématodes sur les gazons).

La population française est potentiellement exposée aux SDHi par l'air, l'alimentation, l'eau, et le sol (utilisation sur les pelouses de stades ou de golfs), ou en milieu professionnel lors de la manipulation et l'épandage des produits. En France, les 118 programmes de surveillance dans les différents milieux s'intéressent à plusieurs SDHi, notamment le boscalide (le plus vendu) qui est surveillé et détecté dans le compartiment aérien et les systèmes aquatiques. Le boscalide, avec le flutolanil et la carboxine ont été inclus dans les études françaises de l'alimentation totale (EAT) qui visent à évaluer le risque pour la santé du consommateur et ils font l'objet (avec le bixafène, le fluopyram, le fluxapyroxade, le penthiopyrade et le benzovindiflupyr) d'une surveillance dans les denrées alimentaires. Au niveau européen, les fongicides SDHi ont été quantifiés dans 2,2 % de plus de 500 000 analyses des échantillons d'aliments réalisées en 2018. Parmi seize SDHi mesurés, le fluopyram et le boscalide étaient, de loin, les plus souvent quantifiés et le boscalide a dépassé la limite maximale en résidus dans 0,08 % des échantillons testés. Les SDHi ne figurent pas dans les programmes existants de surveillance biologique humaine en France ; par conséquent, il existe très peu de données sur l'imprégnation de la population générale par ces substances. En France, une seule étude académique, portant sur 311 femmes enceintes de la cohorte ELFE, a quantifié le boscalide avec une fréquence de détection de 63 % dans les cheveux. Aucune étude n'a été retrouvée permettant d'évaluer l'exposition des professionnels aux SDHi.

Le mécanisme d'action des fongicides SDHi est basé sur la perturbation du fonctionnement mitochondrial par l'inhibition de l'activité SDH, un complexe enzymatique impliqué dans la respiration cellulaire (complexe II) et donc essentiel à la vie. Chez l'être humain, les conséquences d'une inactivation génétique de la SDH (mutation de l'un des quatre gènes codant les sous-unités de l'enzyme) sont bien documentées avec le développement de pathologies neurologiques et cancéreuses, notamment liées à l'accumulation du substrat de la SDH, le succinate. Un niveau élevé de cet « oncométabolite » peut entraîner des processus associés à la tumorigenèse : notamment une dérégulation de l'homéostasie métabolique, un stress oxydant induisant un état de « pseudo-hypoxie » cellulaire, des modifications épigénétiques, et la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse impliquée dans le processus métastatique. Si les perturbations mitochondriales d'origine génétique chez l'être humain prédisposent à de nombreuses pathologies, cela ne signifie pas ipso facto qu'une inhibition partielle ou totale de l'activité de la SDH, par exemple dans le cas d'une exposition chronique aux SDHi, entraînerait les mêmes effets physiopathologiques.

Néanmoins, le complexe SDH est fortement conservé entre espèces. En effet, des études de cristallographie et de génétique ont montré que la structure de la SDH est conservée d'une espèce à l'autre avec des séquences peptidiques homologues au niveau du site catalytique. Tout ceci conduit à s'interroger légitimement sur les conséquences délétères des expositions aux SDHi sur la santé humaine et sur la biodiversité. Malgré la conservation de la structure de la SDH au cours de l'évolution, certains travaux suggèrent une variabilité importante du profil d'inhibition de son activité par différents SDHi selon les espèces. Ces études reposent sur des mesures de la concentration inhibitrice médiane (IC50), ce qui correspond, dans ce cas-ci, à la concentration d'un SDHi donné inhibant à moitié l'activité de la SDH. Toutefois, les résultats de ces études sont difficiles à comparer du fait de différences voire de lacunes méthodologiques. Les données actuellement disponibles sont donc insuffisantes pour conclure à une spécificité des SDHi pour la SDH des champignons et à leur innocuité pour les espèces non-cibles. Pour cela, il est nécessaire d'une part de produire *in vitro* des données d'IC50 à partir d'échantillons de nature homogène et d'autre part de générer des données expérimentales *in vivo* dans des modèles animaux, prenant en compte les caractéristiques de toxicocinétique, de toxicodynamique et de biotransformation des SDHi dans les organismes entiers.

Concernant les effets toxiques potentiels des SDHi sur différentes espèces, une série d'études sur les poissons-zèbres, dont la moitié ont été publiées par le même groupe de recherche, montrent que l'exposition aux SDHi pourrait entraîner des anomalies de développement et de nombreuses malformations ainsi que des perturbations du métabolisme, de la fonction thyroïdienne, ou de la reproduction. Ces effets suggèrent que ces fongicides pourraient être considérés, au moins chez cette espèce, comme des perturbateurs endocriniens.

Quelques études ont exploré les effets des SDHi sur les écosystèmes. Elles ont montré que, chez les abeilles, l'exposition au boscalide modifie la composition du microbiote intestinal et a un impact sur le comportement. D'autres études ont mis en évidence des effets délétères sur des organismes du sol (toxicité et effets sur le comportement chez les nématodes et lombrics) et les organismes aquatiques (toxicité chez les algues et effets tératogènes chez des amphibiens). Ces études mériteraient d'être poursuivies afin de documenter les impacts des SDHi sur la biodiversité et éventuellement sur la régulation des écosystèmes et leurs répercussions sur la santé humaine.

Les données de cancérogénicité sur les SDHi, analysées ici, proviennent exclusivement des rapports des agences sanitaires européennes qui publient les conclusions des évaluations des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché élaboré par les entreprises. Selon ces conclusions, la majorité des SDHi ne présentent aucune génotoxicité. Cependant, pour la majorité des SDHi, les études chez les rongeurs montrent une augmentation de l'incidence des adénomes et des carcinomes dans différents organes : principalement le foie mais aussi la thyroïde, le poumon et l'utérus avec pour certains un dimorphisme sexuel. En dépit de ces observations, la grande majorité des SDHi autorisés au niveau européen ne sont pas classifiés par les instances réglementaires comme des substances susceptibles ou suspectées de provoquer le cancer. Ces conclusions ont été tirées sur la base du mode d'action rapporté par des études industrielles pour rendre compte des effets cancérogènes des SDHi chez le rongeur qui implique l'activation du récepteur nucléaire CAR (constitutive androstane receptor). Ce mode d'action est considéré comme spécifique aux rongeurs et n'a pas été jugé pertinent pour l'être humain par les agences sanitaires. Ces problématiques concernant le mode d'action ainsi que les modèles expérimentaux utilisés font encore l'objet de débat au sein de la communauté scientifique et au sein même des agences et il n'est pas possible d'exclure

actuellement que d'autres mécanismes d'action mis en jeu dans la transformation tumorale que celui concernant le récepteur CAR soient impliqués, et pertinents pour l'être humain.

Concernant les tests réglementaires, des réflexions sont en cours au sein de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) sur l'évaluation du potentiel cancérigène des substances non reconnues comme étant génotoxiques telles que les SDHi. Le groupe d'experts international de l'OCDE a reconnu dans cette déclaration de consensus le besoin d'élargir l'évaluation avec des essais in vitro/ex vivo, selon une approche intégrative basée sur le concept des voies d'effets indésirables (adverse outcome pathway), qui consiste à décrire une séquence logique d'évènements liés de façon causale à différents niveaux d'organisation biologique. Certains mécanismes identifiés par l'OCDE sont pertinents pour les SDHi, dont le stress oxydant et l'épigénotoxicité, alors que d'autres mécanismes d'intérêt qui n'ont pas été retenus pourraient comprendre notamment la mitotoxicité et la transition épithélio-mésenchymateuse. Les tests visant à établir le caractère cancérigène ou non d'une substance pourraient également intégrer la notion d'impact sur la progression tumorale (promotion/métastase), le processus d'initiation criblé notamment par les tests de génotoxicité et de mutagénicité n'étant pas le seul impliqué dans la pathologie cancéreuse. Cependant, faire des recommandations précises sur l'amélioration des essais et des modèles en toxicologie réglementaire nécessiterait d'analyser l'ensemble des processus et des essais utilisés, ce qui dépasse largement le cadre de cette expertise.

Enfin, comme pour tous les pesticides, la toxicologie réglementaire évalue les substances actives et pas les formulations. Or, pour les SDHi, certaines formulations contiennent des fongicides de la famille des strobilurines qui inhibent la respiration cellulaire au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire et qui pourraient donc potentialiser les effets sur la fonction mitochondriale. Cela souligne l'importance de tester non seulement les substances actives mais aussi les formulations dans des études de toxicologie.

Concernant les effets chez l'être humain, il n'existe à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets possibles des substances actives SDHi sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La seule étude ayant examiné cette question, menée sur les participants de la cohorte ELFE, n'a pas montré d'association entre l'exposition au boscalide pendant la grossesse et la croissance intra-utérine. En utilisant une estimation indirecte de l'exposition aux SDHi, c'est-à-dire en considérant les tâches ou activités agricoles potentiellement exposantes aux SDHi, présents sur le marché depuis plusieurs décennies et compatibles avec les délais d'apparition de pathologies (par exemple cancéreuses ou dégénératives), les rares données disponibles ne révèlent pas de signal laissant supposer un sur-risque spécifique dans ces populations agricoles. Très peu de données sont donc disponibles chez l'être humain pour évaluer le risque lié à l'utilisation des SDHi. Un renforcement de la biosurveillance humaine, l'exploitation de cohortes existantes (AGRICAN, ELFE...) à court terme et à plus long terme, la mise en place de nouvelles études épidémiologiques, pourraient permettre de mieux cerner les conséquences potentielles d'une exposition professionnelle ou non professionnelle aux SDHi sur la santé humaine. »

6 Analyse des VTR issues de l'évaluation européenne des substances actives

Pour chaque substance, les informations relatives à la toxicocinétique sont résumées.

Une description des VTR actuellement en vigueur est présentée suivie d'une analyse critique de la part du GT de l'étude clé et des effets critiques pouvant mener à la proposition d'une nouvelle VTR.

Le résumé des données de toxicocinétique et l'analyse critique des VTR se basent principalement sur les résumés rapportés dans les dossiers d'évaluation européen, la bibliographie n'ayant pas permis d'identifier des études de toxicologie adéquate pour élaborer des VTR selon la méthodologie européenne.

Un niveau de confiance est attribué aux VTR retenues par le GT afin de souligner les limites pouvant être associées à la base de données, à l'étude clé et/ou à l'effet critique.

Dans certains cas, des points d'attention spécifiques à la substance considérée sont également notés. Ces points d'attention n'impactent pas les VTR mais permettent l'identification de préoccupations, pouvant être en lien avec les effets critiques ou la qualité des données disponibles.

Enfin, concernant les effets toxiques communs à plusieurs SDHI, ceux-ci sont décrits dans la section relative aux toxicités par organes (section 8).

6.1 Benzovindiflupyr

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2015), des conclusions de l'EFSA (2015), de la proposition de classification soumise par un Etat-Membre (2014) et de l'opinion du RAC (2014). Les rapports d'études sur 90 jours chez le rat et sur 2 générations chez le rat ont également été consultés. Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.1.1 Partie toxicocinétique

Le benzovindiflupyr consiste en un mélange de deux énantiomères actifs à 50:50.

Le benzovindiflupyr utilisé dans les études de toxicocinétique est marqué au ¹⁴C sur le cycle pyrazole (décision prise à la suite d'une étude préliminaire sur les cycles phényle et pyrazole ne montrant aucune différence).

L'étude de la toxicocinétique est réalisée chez le rat mâle et femelle par une exposition unique à 1 ou 40 mg/kg pc¹³, par gavage dans une suspension 1% de carboxyméthylcellulose (CMC) et 1% de Tween 80.

L'absorption est d'environ 80% pour la dose de 1 mg/kg pc et de 60% pour la dose de 40 mg/kg pc, et ce, indépendamment du sexe. Pour les doses de 1 et 40 mg/kg pc, la concentration maximale (C_{max}) plasmatique est observée, respectivement, entre 2 et 4 heures et entre 6 et 24 heures.

¹³ Poids corporel

Le benzovindiflupyr et ses métabolites, se distribuent dans tous les tissus. Les concentrations tissulaires 72 heures après l'exposition à 40 mg/kg de pc sont retrouvées par ordre décroissant dans la glande de Harder (10,2 – 8,03 µg eq/g de tissu), le foie (2,48- 1,29 µg eq/g de tissu) et le rein (1,69-0.73 µg eq/g de tissu) pour les mâles et les femelles, respectivement.

Le benzovindiflupyr est rapidement et extensivement métabolisé (70-85% de la radioactivité) impliquant des réactions de déméthylation, hydroxylation, ouverture de cycles et conjugaison. Deux métabolites majeurs (le SYN546041 et le SYN546360) représentant ensemble entre 35 et 60% de la radioactivité sont obtenus soit par hydroxylation soit par glucuroconjugaison. Aucune différence significative dans les métabolites n'est observée entre les deux doses de 1 et 40 mg/kg pc. Le métabolisme est similaire chez plusieurs espèces (différents mammifères, poule, etc.).

Il est éliminé avec une demi-vie plasmatique de 55 heures chez les mâles et 29 heures chez les femelles aux deux doses utilisées sans accumulation dans un tissu. Il est à noter que la concentration plasmatique est supérieure chez les mâles, comparée aux femelles.

La radioactivité (substance et métabolites) est rapidement éliminée (91-97% après 48 heures). L'excrétion se fait principalement dans les fèces *via* la voie biliaire (79-89% après 120 heures). L'excrétion urinaire est assez faible (5-9%) sur une période de 120 heures. Les métabolites sont présents à moins de 2% dans les urines. Quarante-huit heures après l'exposition, on retrouve 6,1% de la radioactivité dans la carcasse. Sept jours après exposition, on retrouve 1-1,8% de la radioactivité dans les tissus et la carcasse.

Après une exposition répétée par voie orale de 1 mg/kg pc/j chez les rats mâles (pendant 14 jours), il est observé une large distribution tissulaire augmentant au cours du temps et atteignant un plateau vers la fin de l'exposition. La concentration la plus forte est retrouvée dans le foie puis dans le rein, mais la radioactivité est mesurable dans tous les tissus avec une décroissance dès l'arrêt de l'exposition.

En conclusion, le benzovindiflupyr est rapidement absorbé, distribué et métabolisé d'après les expérimentations décrites.

6.1.2 Revue des valeurs de référence

6.1.2.1 AOEL

6.1.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude réalisée sur 2 générations (OCDE 416) chez le rat par voie orale. Une étude de 90 jours (OCDE 408) réalisée également chez le rat par voie orale est utilisée en support.

Pour l'étude sur 2 générations, des groupes de 25 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 25, 100 ou 600 ppm de benzovindiflupyr pour les mâles et 0, 25, 100 ou 250 ppm pour les femelles. Les équivalences en mg/kg pc/j sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j

	Mâles			Femelles		
	25 ppm	100 ppm	600 ppm	25 ppm	100 ppm	250 ppm

Période pré-accouplement						
Génération P	1,7	6,8	40,5	2,0	8,2	19,4
Génération F1	1,9	7,8	48	2,1	8,7	22
Période post-accouplement						
Génération P	1,2	4,9	29,7	-	-	-
Génération F1	1,3	5,2	32,5	-	-	-
Période de gestation						
Génération P	-	-	-	1,9	7,6	17,5
Génération F1	-	-	-	2,0	7,9	18,3
Période de lactation						
Génération P	-	-	-	4,1	16,8	40,2
Génération F1	-	-	-	4,3	17,2	43,1

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont les suivants :

- Une diminution de poids corporel et du gain de poids corporel est rapportée chez les mâles et les femelles des deux générations.
- Une augmentation du poids relatif du foie avec une hypertrophie centrolobulaire est observée pour les mâles des deux générations. L'augmentation du poids relatif du foie est aussi augmentée chez les femelles de la génération F1, sans modification histologique.
- Une hypertrophie de la pars distalis de l'hypophyse est observée chez le mâle et une hypertrophie de la zona granulosa des corticosurrénales chez la femelle (F1).
- Des anomalies des spermatozoïdes sont trouvées chez les mâles de la génération parentale.
- Une diminution du nombre moyen de corps jaunes, une augmentation de l'incidence du diestrus lactationnel sont observées pour la génération parentale.
- Le poids des nouveaux-nés F1 et F2 est diminué et un retard de maturité sexuelle pour les mâles est observé pour le groupe exposé à 250 ppm.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 600 et 100 ppm.

En comparaison, dans l'étude de 90 jours, des groupes de 10 rats par groupe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 750 ou 1500 ppm de benzovindiflupyr correspondant à des expositions de 0 ; 7,6 ; 53,8 ou 108,7 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 8,2 ; 58,8 ou 108,8 mg/kg pc/j pour les femelles. Les effets critiques (statistiquement significatifs) correspondent à une diminution du poids corporel, une diminution du poids relatif hépatique et une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires associée à des modifications biochimiques (diminution de la glycémie et des phosphatases alcalines chez les femelles et augmentation de l'urée chez les mâles, sans autre altération des paramètres urinaires. La LOAEL et la NOAEL pour cette étude sont de 750 ppm (soit 53,8 et 58,8 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement) et de 100 ppm (soit 7,6 et 8,2 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement). La NOAEL

est en cohérence avec celle de l'étude sur 2 générations, mais légèrement supérieure et, en conséquence, non retenue pour la dérivation de l'AOEL.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est donc la NOAEL de 6,8 mg/kg pc/j chez les mâles dans l'étude sur deux générations. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction de l'absorption par voie orale de 60%, l'AOEL établie est de 0,04 mg/kg pc/j.

6.1.2.1.2 Analyse critique du GT

Cette valeur d'AOEL est contestée par le GT sur la base des deux études car les NOAEL établies correspondent en fait à des LOAEL. Les arguments sont les suivants :

- dans l'étude sur 2 générations pour une exposition à 100 ppm (6,8 mg/kg pc/j), une diminution statistiquement significative de la motilité des spermatozoïdes est rapportée dans la génération parentale. Le GT note que même si cet effet sur la mobilité n'est pas retrouvé à la dose supérieure, des altérations spermatiques sont observées à la dose de 600 ppm. Une faible augmentation de l'incidence du diestrus post-lactation (dont l'incidence est encore plus augmentée à la dose supérieure) est également observée dans la génération parentale. Pour la génération F1, une diminution statistiquement significative du dépôt de glycogène au niveau hépatique est observée chez les femelles ainsi qu'une faible augmentation (non précisée dans le dossier réglementaire) de la durée du diestrus post-lactation ainsi que du proestrus.
- dans l'étude de 90 jours, pour une exposition à 100 ppm (7,6 mg/kg pc/j pour les mâles et 8,2 mg/kg pc/j chez les femelles), certaines valeurs de constantes biochimiques plasmatiques sont statistiquement différentes de celles du contrôle. L'analyse statistique réalisée sur la base des valeurs expérimentales issues de l'étude a été refaite par le GT en raison du test utilisé qui n'était pas applicable pour certaines distributions des valeurs. Ainsi, il ressort une augmentation non dépendante de la dose de l'aspartate aminotransférase (AST) (mâle) et de la glutamate déshydrogénase (GLDH) (femelle) ainsi qu'une diminution dépendante de la dose de la phosphatase alcaline (ALP).

En conclusion, considérant que la valeur de 100 ppm correspond à une LOAEL, le GT considère que l'AOEL devrait être revue. Deux options ont été discutées :

- utiliser la LOAEL de 100 ppm (dose la plus faible testée), équivalente à 7,6 mg/kg pc/j, sur la base de l'étude de 90 jours chez le rat ;
- utiliser la NOAEL de 25 ppm correspondant à 1,2 mg/kg pc/j chez les rats mâles de la génération parentale dans l'étude sur 2 générations. L'effet critique dans cette génération se manifeste par une diminution de la motilité spermatique à la dose de 100 ppm et par une atteinte morphologique à la dose de 600 ppm. Les autres effets critiques correspondent à une augmentation du diestrus et du pro-estrus et une diminution du glycogène hépatique chez les femelles.

Les membres du GT ont retenu la deuxième option sur la base d'une NOAEL à 25 ppm d'après l'étude sur 2 générations. Cette option conduit à une VTR plus robuste, l'option 1 étant associée à plus d'incertitudes car basée sur une LOAEL.

Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL retenue par le GT est de 0,012 mg/kg pc/j. Aucune

correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est de 80% si on prend en compte la dose faible de 1 mg/kg pc dans l'étude de pharmacocinétique.

Un niveau de confiance global **moyen-faible** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : concernant les études pertinentes pour la dérivation d'une AOEL, il existe une étude sur 2 générations chez le rat et des études sur 28 et 90 jours chez le rat. Les études effectuées suivent les requis réglementaires mais présentent un écart variable dans le choix des doses. Dans l'étude sur 90 jours chez le rat, les doses d'exposition sont de 100, 750 et 1500 ppm, soit un rapport de 7,5 et 2. De même, pour l'étude sur 2 générations chez les rats, les doses d'exposition sont de 25, 100 et 600 ppm, soit un rapport de 4 et 6.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques retenus pour l'AOEL proposée par le GT sont des anomalies de la motilité des spermatozoïdes, une augmentation de l'incidence du diestrus et la diminution du dépôt de glycogène dans le foie. Le mode d'action n'est pas connu avec aucune donnée sur l'engagement de la cible (inhibition de la SDH). Ces effets sont considérés par défaut comme transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est une étude sur 2 générations chez le rat. Bien que de durée adaptée pour dériver une AOEL, elle présente des limites. Cependant le GT a pris en compte des effets significatifs (poids de la rate, dépôt de glycogène au niveau hépatique) et des données en histopathologie (hypertrophie hépatocellulaire en région centrolobulaire pour les générations P et F1, gouttelettes lipidiques hépatiques pour les F1).
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 5 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance

<p>↓ poids corporel, hypertrophie du foie, de l'hypophyse, et de la zone glomérulaire des surrénales chez les parents</p> <p>Sperme anormal, ↓ des follicules ovariens en croissance et des corporea lutéa et ↑ incidence diestrus lactationnel</p> <p>Chez les petits : ↓ poids corporel, ↑ poids du foie et retard de maturation sexuelle chez les mâles</p> <p>(étude sur 2 générations chez le rat)</p>	6,8	100 (60%)	0,04	<p>↓ motilité spermatique, ↑ incidence diestrus lactationnel, ↓ dépôt glycogène hépatique</p> <p>(étude sur 2 générations chez le rat)</p>	1,2	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,012 Moyen faible
---	-----	--------------	------	--	-----	--	----------------------------------

6.1.2.2 DJA

6.1.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de toxicité chronique et de cancérogénèse de 2 ans (OCDE 452) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 52 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 25, 100 ou 600 ppm de benzovindiflupyr pour les mâles (correspondant à 0 ; 1,21 ; 4,88 et 30,17 mg/kg pc/j) ou 0, 25, 100 ou 400 ppm de benzovindiflupyr pour les femelles (correspondant à 0 ; 1,65 ; 6,66 et 27,44 mg/kg pc/j) pendant 104 semaines.

Les effets critiques (statistiquement significatifs) concernent une diminution du poids corporel, des modifications biochimiques (diminution des ALP, ALAT et ASAT) et une hypertrophie hépatique accompagnée d'une vacuolisation des hépatocytes centrolobulaires et des foyers éosinophiles hépatiques chez les mâles ainsi que des hépatocytes pigmentés chez les femelles. Une augmentation statistiquement significative des adénomes des cellules folliculaires thyroïdiennes est également rapportée chez les mâles. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 400/600 ppm et 100 ppm chez les rats.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 4,88 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,05 mg/kg pc/j.

6.1.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

En effet, elle se base sur la NOAEL la plus basse après une exposition chronique, les valeurs de NOAEL étant légèrement supérieures d'après l'étude de cancérogenèse chez la souris ou de toxicité chronique chez le chien.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : concernant la toxicité chronique, il existe des études sur 2 ans chez le rat, 1,5 an chez la souris et 1 an chez le chien.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont une diminution de poids corporel, une hypertrophie hépatique associée à des modifications biochimiques ainsi que des adénomes thyroïdiens. Les effets hépatiques et sur le poids sont observés dans plusieurs études. Le mode d'action n'est pas connu de même que l'engagement de la cible (inhibition de la SDH). Ces effets sont considérés par défaut comme transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude 2 ans chez le rat a été sélectionnée comme étude clé. Elle est de durée adaptée pour dériver une DJA.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 6 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
↓ gain de poids corporel, effets hépatiques (incluant hypertrophie et vacuolisation) et thyroïdiens (adénome) (étude 2 ans chez le rat)	4,9	100	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.1.2.3 ARfD

6.1.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de neurotoxicité aiguë (OCDE 424), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont reçu une dose unique de 0, 10, 30 ou 80 mg/kg pc par gavage. Les animaux ont été observés pendant 14 jours.

L'effet critique (statistiquement significatif) correspond à des observations cliniques de neurotoxicité chez les femelles telles qu'une diminution de force d'agrippement (« grip test »), d'activité motrice et de la température corporelle. Une diminution statistiquement significative du gain de poids corporel est également rapportée chez les femelles. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 30 mg/kg pc et 10 mg/kg pc chez les rats femelles.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 10 mg/kg pc. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,1 mg/kg pc.

6.1.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. En effet, elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité aiguë ou court terme.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : concernant la toxicité court terme, il existe une étude de neurotoxicité en exposition aiguë chez le rat et des études de toxicité sur le développement prénatal chez le rat et le lapin. La NOAEL d'après les effets neurotoxiques est de 10 mg/kg pc et celle pour la toxicité développementale est de 15 mg/kg pc/j. Les études suivent les lignes directrices de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont des effets neurotoxiques (effet sur le grip test, sur l'activité motrice et la température corporelle) et une perte de poids. Une perte de poids est notée dans d'autres études. Le mode d'action n'est pas connu de même que l'engagement de la cible (inhibition de la SDH). Ces effets sont considérés par défaut comme transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de neurotoxicité en exposition aiguë chez le rat a été retenue comme étude clé. Elle est de durée adaptée pour dériver une ARfD. La ligne directrice 426 de l'OCDE manque de critères d'évaluation pour évaluer des effets neurocomportementaux et neurodéveloppementaux.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 7 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le benzovindiflupyr

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD actuelle (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance

Observations cliniques de neurotoxicité (↓ force d'agrippement, activité motrice, température), ↓ gain de poids corporel (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)	10	100	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen
---	----	-----	-----	--

6.1.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Effet prolifératif

Des adénomes de cellules folliculaires de la thyroïde sont observés chez les rats (étude à 2 ans) à la plus forte dose (600 ppm, 30,17 mg/kg pc/j). Cet effet est dépendant de la dose et observable dès la plus faible dose mais l'augmentation est non significative par rapport au groupe contrôle.

Chez des rats exposés pendant 14 jours avec une phase de réversibilité de 63 jours, sont notées une stimulation des enzymes hépatiques et une diminution du taux d'hormones thyroïdiennes. Néanmoins, l'augmentation de taille du tissu thyroïdien est observée dès les premiers jours avant la mise en évidence de la stimulation enzymatique hépatique et à des doses inférieures. Ce résultat contredit l'hypothèse mécanistique des pétitionnaires sur un effet thyroïdien secondaire à une stimulation enzymatique hépatique. Ces résultats suggèrent des incertitudes sur le mécanisme d'action impliqué dans l'hyperplasie thyroïdienne et invalide en partie sa non-transposabilité des rongeurs aux humains.

De plus, l'étude de cancérogénicité chez la souris montre une augmentation des tumeurs de la glande de Harder. Bien que la glande de Harder soit vestigiale chez l'humain, l'induction de cette tumeur chez la souris témoigne d'un effet cancérogène corrélé avec la distribution du benzovindiflupyr qui est retrouvé principalement dans cet organe.

Incertitude sur les données histologiques présentées dans l'étude sur 90 jours chez le rat

Dans l'étude sur 90 jours, il est noté une absence de lésions histologiques chez les rats mâles et femelles exposés à la dose de 100 ppm (correspondant à 7,6 et 8,2 mg/kg pc/j, respectivement) contrairement aux nombreuses lésions histologiques constatées dans le groupe contrôle. Ce résultat inattendu n'a pas été commenté dans le dossier réglementaire, que ce soit par l'Etat-membre rapporteur ou par l'EFSA.

Potentiel perturbateur endocrinien

Des effets en reprotoxicité et toxicité pour le développement prénatal ont été observés. Sur la base de cette constatation, il est écrit dans le volume 3B6 : *“the majority of the experts agreed on a data gap for further assessment of the endocrine-mediated properties of benzovindiflupyr”*.

6.2 Bixafen

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2011) et des conclusions de l'EFSA (2012). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.2.1 Partie toxicocinétique

Dans une étude de toxicocinétique, le bixafen est radiomarké au ^{14}C soit sur le noyau diphényle, soit sur le noyau pyridine. L'étude est réalisée chez le rat par une exposition unique à 2 ou 50 mg/kg pc par gavage dans une suspension contenant 0,5% de tragacathe.

Le composé est fortement absorbé par le tractus gastro-intestinal (GIT), soit entre 86 à 89%, 48 heures après l'exposition. La demi-vie ($T_{1/2}$) d'absorption est estimée à 45 minutes. En comparant différentes doses d'exposition, il semble que le taux d'absorption soit dose-dépendant, avec une saturation à des doses approchant 50 mg/kg pc.

Une fois absorbés, le bixafen et ses métabolites se distribuent dans tous les organes avec une concentration maximale 1 heure après l'ingestion. Près d'une trentaine de métabolites sont formés.

Il est ensuite excrété à 97% sous forme de composés parents ou métabolites dans les premières 48 heures pour une dose unique de 2 mg/kg pc comparé à 55% à 50 mg/kg pc suggérant une saturation dans la formation des métabolites. La demi-vie dans le plasma est de 5 heures. Ces résultats sont à prendre avec précaution, car la $T_{1/2}$ est estimée en utilisant le ^{14}C . Le composé parent et les métabolites sont éliminés dans le GIT majoritairement, *via* la bile. Entre 88 et 94% de la dose administrée se retrouvent dans les fèces, et environ 1,1 à 1,2 % dans l'urine après 48 heures. Moins de 0,1% de la dose administrée est exhalée sous forme de CO_2 ou autre composé volatil. Entre 75 et 95 % des métabolites sont identifiés dans les fèces.

Finalement, le bixafen est un composé rapidement absorbé et distribué, qui reste très peu de temps dans sa forme parent et est éliminé rapidement, sans accumulation de la substance dans les tissus biologiques.

6.2.2 Revue des valeurs de référence

6.2.2.1 AOEL

6.2.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de 90 jours (OCDE 408), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe, ont consommé des aliments contenant 0, 50, 200, 800 ou 2000 ppm de bixafen dans l'aliment, correspondant à 0 ; 3,2 ; 12,9 ; 50,4 ; 130 mg/kg pc/j pour les mâles et à 0 ; 3,9 ; 15,0 ; 59,2 ; 153 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques identifiés sont une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires et une hypertrophie des cellules folliculaires thyroïdiennes (statistique non renseignée dans le dossier réglementaire). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 800 ppm et 200 ppm respectivement chez les rats.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 12,9 mg/kg pc/j chez les mâles. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces,

10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,13 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.2.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

La justification du choix de l'étude clé parmi l'ensemble des études subchroniques et du développement a été discutée par le GT. Si les sensibilités du rat et de la souris sont considérées par le GT comme comparables, les données montrent cependant une sensibilité moins importante du rat dans les études de 90 jours d'exposition (LOAEL = 50,4-59,2 mg/kg pc/j) comparé à la souris (LOAEL = 34,3-42,9 mg/kg pc/j). Toutefois, dans les études de 28 jours ou à long terme (études de 18 mois ou de 2 ans), le rat semble plus sensible que la souris. Le GT s'est interrogé sur le choix de l'étude de 90 jours plutôt que celle de 28 jours d'exposition chez le rat. Cette dernière étude montre en effet des NOAEL (3,5-4,12 mg/kg pc/j) et LOAEL (24,6-27,7 mg/kg pc/j) notablement inférieures.

La discussion du GT a aussi porté sur l'interprétation de certaines modifications de paramètres hépatiques et/ou biochimiques rapportées dans l'étude de 28 jours. Une légère augmentation (~5 %) du poids relatif du foie et une diminution du taux de bilirubine (~ 30%), non statistiquement significatives, sont rapportées à la NOAEL définie dans le dossier réglementaire. Des critères pour distinguer les effets hépatiques adaptatifs des effets néfastes ont été utilisés par le GT pour conclure sur la pertinence de prendre en compte ou non l'hypertrophie hépatocellulaire, à la lueur des modifications fonctionnelles éventuellement associées, et prenant en compte la cohérence des résultats obtenus selon les durées d'exposition (Hall et al. 2012; OMS 2015; HED TOXicology Science Advisory Council 2002).

Finalement, le choix de l'étude sur 90 jours plutôt que celle de 28 jours a été retenu par le GT pour la détermination de l'AOEL en l'absence d'éléments fonctionnels ou/et lésionnels statistiquement significatifs à la NOAEL et en prenant en compte le fait que la seule modification fonctionnelle observée dans l'étude sur 28 jours était une diminution de la bilirubine considérée comme réversible. En effet, dans l'étude de 90 jours, un groupe de rats exposé à 40 fois la NOAEL et soumis à une récupération d'un mois après la fin de l'exposition, a montré un taux de bilirubine revenu à la normale. Enfin, il est à noter que la NOAEL de l'étude sur 90 jours est inférieure à la LOAEL de l'étude sur 28 jours.

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études (28 jours, 90 jours) sur 2 espèces (rats et souris) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet hépatique est un effet bien identifié et reproductible entre mâles et femelles. Les autres études disponibles montrent également des atteintes hépatiques presque systématiques. Ces effets sont considérés par défaut comme transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé retenue est une étude de 90 jours chez le rat de bonne qualité (6 doses, contrôle négatif, 10 animaux par dose et par sexe) et d'une durée adaptée pour dériver une AOEL.
- **le choix du point de départ** : un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 8 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen

Dossier réglementaire	Conclusion du GT sur la base des données actuelles
-----------------------	--

Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Hypertrophie du foie et des cellules folliculaires thyroïdiennes (étude 90 jours chez le rat)	12,9	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,13	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			

6.2.2.2 DJA

6.2.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de toxicité chronique et de cancérogénèse sur 2 ans (OCDE 453), conduite chez le rat par voie orale.

Dans l'étude originale, les rats mâles ont été sacrifiés prématurément à la suite d'effets toxiques considérés reliés à une nourriture déficiente en vitamine K. Concernant les femelles, des groupes de 70-80 animaux ont consommé des aliments contenant 0, 50, 300 ou 2000 ppm de bixafen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 2,81 ; 17,4 ou 117 mg/kg pc/j. Une étude complémentaire a été réalisée chez les rat mâles. Des groupes de 60 animaux ont consommé des aliments contenant 0, 50, 300 ou 2000 ppm de bixafen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 2,0 ; 12, ou 80,5 mg/kg pc/j.

Les effets critiques sont les suivants :

- une augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif du foie, associée à une augmentation du taux de cholestérol et d'ASAT (dont les significativités statistiques varient en fonction du moment du prélèvement), à une diminution statistiquement significative du taux de bilirubine sanguin, ainsi que des lésions histologiques dont une hypertrophie centrolobulaire hépatique (augmentation statistiquement significative) ;
- Une hypertrophie des cellules folliculaires thyroïdiennes et des altérations thyroïdiennes colloïdales (augmentations statistiquement significatives).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 300 ppm et 50 ppm chez les rats des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 2,0 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,02 mg/kg pc/j.

6.2.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR selon le GT, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : au moins 2 espèces (rat et souris) ont été étudiées dans 3 études dont 2 de 2 ans (chez le rat, l'une chez des mâles et l'autre chez des femelles) et une de 18 mois (chez la souris mâle et femelle).
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : Les effets critiques identifiés sont une hypertrophie folliculaire thyroïdienne et des altérations de la colloïde, ainsi qu'une hypertrophie hépatique. Ces effets, observés chez la souris et le rat, sont considérés par défaut comme transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : Il s'agit de l'étude de cancérogénicité chez les rats. L'étude chez la souris n'est pas retenue car même si les effets sont similaires, les doses sont légèrement supérieures donc moins protectrices dans la détermination de la DJA.
- **le choix du point de départ** : Un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 9 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le foie (incluant une hypertrophie et une augmentation du cholestérol) et sur la thyroïde (altération de la colloïde) (étude 2 ans chez le rat)	2	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

Une position divergente concernant la DJA retenue par le GT pour le bixafen est présentée en annexe.

6.2.2.3 ARfD

6.2.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité développementale (OCDE 414), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 23 femelles ont reçu 0, 20, 75 ou 250 mg/kg pc/j de bixafen par gavage du 6^{ème} au 20^{ème} jour de leur gestation.

L'effet critique est une perte du poids maternel et une diminution du poids fœtal, statistiquement significatives. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 75 mg/kg pc/j et 20 mg/kg pc/j chez les rats, respectivement.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 20 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,02 mg/kg pc/j.

6.2.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

La NOAEL de 20 mg/kg pc/j observée dans cette étude est supérieure à celle décrite dans l'étude de 28 jours d'exposition chez le rat (3,5 mg/kg pc/j). Il est noté que l'étude sur le développement ne comporte pas d'analyse nécropsique et fonctionnelle aussi approfondie que dans l'étude de 28 jours. Cependant, les éléments rapportés dans l'étude de 28 jours, montre l'absence de modifications fonctionnelles irréversibles accompagnant les altérations morphologiques hépatiques. Ceci ne justifie pas de retenir cette étude dans la détermination de l'ARfD.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : au moins 2 espèces (rat, et lapin) ont été étudiées dans de nombreuses études à court terme dont 4 sur le développement (3 études chez les rats utilisant 2 souches (SD et Wistar) et 2 études chez les lapins). Les doses sont similaires dans les études.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques (diminution du poids corporel parental et fœtal) sont considérés comme transposable chez l'humain. Le mode d'action n'est pas connu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est une étude sur la toxicité sur le développement prénatal de bonne qualité (23 femelles gestantes par dose, 4 doses, exposition GD6-20) et d'une durée adaptée pour dériver une ARfD.
- **le choix du point de départ** : Un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 10 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le bixafen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance de
Diminution du poids maternel et fœtal (étude de toxicité prénatale chez le rat)	20	100	0,2	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

6.3 Boscalid

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2002 et 2018 [documents soumis à consultation publique]). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.3.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, le boscalid est marqué au ^{14}C sur le noyau pyridine ou diphenyle et solubilisé dans une solution aqueuse de 5% de carboxyméthylcellulose (CMC). Une faible dose (50 mg/kg pc) et une forte dose (500 mg/kg pc) sont administrées chez le rat dans des scénarios d'expositions uniques ou répétées pendant 15 jours.

La fraction de boscalid absorbée est variable en fonction de la dose d'exposition. Elle correspond à 44% pour la dose de 50 mg/kg pc et à 12% pour la dose de 500 mg/kg pc. La concentration sanguine maximale (C_{max}) est similaire entre mâles et femelles. En revanche, une augmentation de la dose d'un facteur de 10 conduit seulement à une augmentation du C_{max} ou de l'aire sous la courbe (AUC) d'un facteur 3, expliqué par la faible absorption à forte dose. Le T_{max} est relativement similaire (entre 0,5 et 1h) pour les deux doses de même qu'entre mâles et femelles.

Le boscalid se distribue dans tous les organes. Les tissus adipeux et hépatique représentent les tissus les plus chargés en boscalid, 8h après l'exposition. Globalement, il n'y a pas d'accumulation dans des tissus spécifiques.

Les mécanismes impliqués dans le métabolisme sont principalement la glucuronidation, la sulfoconjugaison et l'hydroxylation. Une caractérisation des métabolites montre que 38 métabolites sont formés.

La demi-vie d'élimination terminale semble légèrement plus élevée à faible dose qu'à forte dose, suggérant une induction enzymatique ou encore une faible absorption. La T_{1/2} d'élimination terminale est de 35 heures et 24 heures pour la faible et forte dose, respectivement. Les principaux métabolites excrétés dans l'urine sont le M510F01 (2%), et le M510F02 (8%). Les fèces représentent la voie majeure d'élimination via la bile, avec des teneurs retrouvées en boscalid (33%), M510F01 (18%), et M510F20 (5%). À faible dose, approximativement 20% de la dose administrée est retrouvé dans les urines et 80% dans les fèces après 7 jours. À forte dose, le pourcentage dans les urines est de 4,5% ce qui augmente proportionnellement le pourcentage dans les fèces. Ceci s'explique en partie par la diminution de l'absorption intestinale à forte dose (à 12% et donc une élimination dans les fèces plus importante). L'excrétion biliaire est plus importante à la faible dose (40% après 48 heures) qu'à la forte dose (11%).

6.3.2 Revue des valeurs de référence

6.3.2.1 AOEL

6.3.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée est une étude de toxicité sur 1 an (OCDE 452), conduite chez le chien par voie orale. Dans cette étude, des groupes de 5 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 200, 800, 2000 ou 20 000 ppm de boscalid, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 5,5 ; 21,8 ; 57,4 ou 544 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 5,8 ; 22,1 ; 58,3 ou 592,9 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont les suivants :

- une baisse du poids corporel (non statistiquement significative) et une baisse transitoire mais significative du gain de poids chez les mâles.
- une augmentation statistiquement significative du poids relatif hépatique chez les femelles. Bien que sans altérations microscopiques, celle-ci est associée à plusieurs modifications de paramètres biochimiques, incluant une diminution de

- l'alanine aminotransférase (ALT) et une augmentation de la phosphatase alcaline (PAL), statistiquement significatives chez les mâles à partir de 3 mois d'exposition.
- une augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif de la thyroïde chez les mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 2000 ppm et 800 ppm chez les chiens pour les deux sexes correspondant à 58 et 22 mg/kg pc/j, respectivement.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 22 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction de l'absorption par voie orale de 44%, l'AOEL établie est de 0,1 mg/kg pc/j.

6.3.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

A l'issue d'expérimentations chez le chien (étude d'1 an), le rat et la souris (études de 90 jours) par voie orale, les NOAEL sont du même ordre de grandeur (entre 22 et 34 mg/kg pc/j). L'AOEL a été établie sur la base de l'expérimentation présentant les NOAEL et LOAEL les plus faibles. Les comparaisons entre NOAEL/LOAEL restent cependant limitées par le choix des doses utilisées dans les différentes espèces. En particulier, il est à noter que la NOAEL déterminée lors de l'expérimentation de 90 jours chez le chien est plus faible (7,6 mg/kg pc/j) que celle issue de l'expérimentation de 1 an (22 mg/kg pc/j), tandis que la LOAEL observée reste sensiblement plus élevée (78,1 mg/kg pc/j dans l'étude sur 90 jours versus 57,4 mg/kg pc/j dans l'étude sur 1 an).

Un niveau de confiance global **moyen-fort** été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : cette substance dispose de plusieurs études pour différentes durées d'expositions, ce qui conforte le niveau de confiance.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques identifiés sont une diminution du poids corporel ainsi qu'une augmentation du poids du foie et de la thyroïde. Il y a une convergence dans les effets critiques observés dans différentes études. Ces effets sont considérés transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas connu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est considérée acceptable (5 animaux par dose et par sexe, 5 doses incluant un contrôle négatif) et d'une durée adaptée pour dériver une AOEL.
- **le choix du point de départ** : Un couple NOAEL/LOAEL a été identifié dans l'étude clé. Il n'y a pas de différence de NOAEL entre les mâles et femelles.

Tableau 11 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le boscalid

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Perte de poids, effets	22	100	0,1	Maintien de la VTR actuelle			

hépatiques (augmentation du poids et biochimie altérée), augmentation du poids de la thyroïde (étude 1 an chez le chien)		(44%)		Niveau de confiance : moyen fort
--	--	-------	--	----------------------------------

6.3.2.2 DJA

6.3.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée est une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (OCDE 452), conduite chez le rat par voie orale. Les données de la partie sur la toxicité chronique et de la partie sur la cancérogénicité ont été présentées séparément dans le dossier réglementaire.

Dans l'étude de toxicité chronique, des groupes de 20 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 500, 2500 ou 15000 ppm de boscalid dans l'aliment pendant 24 mois, correspondant à 0 ; 4,4 ; 22 ; 57,4 ; 110 ou 739 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 5,9 ; 30 ; 150 ou 1000 mg/kg pc/j pour les femelles. Des groupes de 50 animaux par dose ont été utilisés pour l'étude de cancérogénicité avec les mêmes doses.

Les effets critiques sont les suivants :

- une incidence accrue (significativité statistique non mentionnée) de foyers d'infiltrations hépatiques de cellules éosinophiles chez les mâles ;
- une anémie chez les mâles (statistiquement significative seulement à la plus forte dose testée) ;
- une augmentation de l'activité de la gamma-glutamyltransférase (Y-GT) et des phosphatases alcalines, atteignant la significativité statistique pour certains prélèvements intermédiaires ;
- une diminution statistiquement significative de la concentration de bilirubine chez les mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 500 ppm et 100 ppm correspondant à 22/30 et 4,4/5,9 mg/kg pc/j respectivement chez les rats des deux sexes (mâle/femelle).

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 4,4 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,04 mg/kg pc/j.

6.3.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR selon le GT, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Il est noté qu'elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité chronique.

Un niveau de confiance global **moyen-fort** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : le corpus de données pour l'investigation de la toxicité chronique comprend une étude sur 2 ans de toxicité chronique et une étude de cancérogénicité chez le rat, ainsi qu'une étude de

cancérogénicité de 18 mois chez la souris. Ces études suivent les lignes directrices de l'OCDE.

- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont une incidence accrue de foyers d'infiltrations hépatiques de cellules éosinophiles ainsi que des modifications biochimiques et hématologiques chez les mâles à 500 ppm.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est jugée de bonne qualité (total de 70 animaux par dose et par sexe, 4 groupes incluant 3 doses d'exposition et le contrôle non exposé) et d'une durée de 24 mois compatible avec la dérivation d'une DJA.
- **le choix du point de départ** : les doses d'exposition permettent de déterminer un couple NOAEL/LOAEL. Il s'agit de la NOAEL la plus faible parmi celles issues des études de toxicité chronique.

Tableau 12 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le boscalid

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le foie, altération hématologique et biochimique. (étude 2 ans chez le rat)	4,4	100	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			

6.3.2.3 ARfD

6.3.2.3.1 Description de l'ARfD

Selon l'EFSA, le profil toxicologique du boscalid ne justifie pas la détermination d'une ARfD.

6.3.2.3.2 Analyse critique du GT

Le GT est en accord avec cette conclusion.

6.3.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Effets thyroïdiens et contrôles historiques

La thyroïde apparaît comme un organe cible d'après les études de toxicité chronique et de cancérogénicité à la dose de 2500 ppm correspondant à 110 mg/kg pc/j pour les mâles et 156 mg/kg pc/j pour les femelles. En effet, il est rapporté une augmentation du poids absolu et relatif de la thyroïde chez les mâles, ainsi qu'une hypertrophie diffuse et une hyperplasie focale des cellules folliculaires pour les deux sexes. Une incidence accrue des adénomes thyroïdiens est observée à 2500 ppm chez les mâles et les femelles (5 et 3 cas respectivement issus des deux études incluant au total 70 animaux, aucune analyse statistique n'est disponible dans le DAR). Chez les mâles, ces adénomes sont également observés à 500 ppm dans les deux études de toxicité chronique (2 cas) et de cancérogénicité (1 cas). Chez les femelles, un cas

isolé observé à 30 mg/kg pc/j (100 ppm) (versus 1 et 3 cas à 156 et 1024 mg/kg pc/j (500 et 2500 ppm) respectivement) est considéré dans le dossier réglementaire comme non lié à la substance active, car situé dans les valeurs des contrôles historiques, bien qu'à leur limite haute. Cependant, le GT s'interroge sur la validité de ces contrôles historiques réalisés sur la période de 1981 à 2000, très antérieure à l'étude, et sans indication de la souche considérée. Ces contrôles historiques ne sont présentés que pour les rats femelles. Les modifications hépatiques adaptatives peuvent expliquer les altérations thyroïdiennes (hyperplasie/adénomes) par des modifications des enzymes de conjugaison hépatiques. L'étude de cancérogénicité chez la souris exposée pendant 18 mois ne fait pas état d'anomalies thyroïdiennes.

6.4 Carboxine

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2006), des conclusions de l'EFSA (2010) et de l'opinion du RAC (2017). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.4.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, la carboxine est marquée au ^{14}C sur le cycle diphenyle et solubilisé dans une solution de polyéthylène glycol (PEG-400). Les études sont réalisées chez le rat avec une exposition unique (de 5 ou 150 mg/kg pc) ou répétée (5 mg/kg pc/j) pendant 14 jours avec le composé non marqué suivi d'une dose le 15^e jour de 5 mg/kg pc marqué au ^{14}C .

La carboxine est facilement absorbée à plus de 80% par le tractus gastro-intestinal. Aucune information concernant la demi-vie d'absorption, le Cmax et le Tmax plasmatique n'est apportée.

La distribution dans les tissus est rapide : 72 heures après l'administration, le foie (0,19%), les hématies (0,08%), ou encore le plasma (0,02%) sont les principaux tissus où l'on retrouve le composé parent ou des métabolites. Les niveaux les plus faibles sont retrouvés dans le tissu adipeux, le cerveau, les gonades, les os et les muscles. L'ensemble de ces paramètres sont similaires quel que soit le sexe ou la dose. La radioactivité résiduelle dans l'ensemble des tissus représente entre 0,2 et 0,4 % de la dose initiale.

Les principaux métabolites sont le para-hydroxy carboxine sulfoxide, le 4-acétamidophenol glucuronide et le 4-4-acétamidophenol. A cela s'ajoute trois autres métabolites mineurs, un conjugué N-acétyl cystéine de l'aniline, la carboxine sulfone et l'acétanilide. Aucune différence, qualitative ou quantitative, n'est observée entre les mâles et les femelles.

Aucun composé parent n'est présent dans les excréta, la carboxine étant largement métabolisée par des processus d'oxydation, d'hydrolyse, de clivage de la fonction amide et de glucuro-conjugaison. Bien que ces études conduites chez le rat Sprague Dawley aient montré l'absence de composé parent dans les excréta, une étude publiée conduite chez la rate Wistar et la lapine New Zealand White exposées par gavage à de la carboxine radiomarquée par le ^{14}C sur le noyau oxathiine ou sur le noyau phényle (environ 235 mg/kg pc) montrent la présence du composé parent dans les fèces (représentant 41 et 10 % de la dose administrée respectivement) (Waring, 1973, citée dans le volume 3B6).

Les métabolites de la carboxine sont largement éliminés dans les urines (65 à 77 % de la dose administrée au cours des premières 24 heures et de 77 à 81 % à 72 heures). L'excrétion par les fèces représente 2 à 9 % de la dose administrée au cours des premières 24 heures et de 6 à 11% à 72 heures. Il est à noter cependant qu'entre 7 et 14 % de la dose administrée ne sont pas retrouvés.

6.4.2 Revue des valeurs de référence

6.4.2.1 AOEL

6.4.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de toxicité de 90 jours (OCDE 408), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 80, 160 ou 240 ppm de carboxine chez les mâles ou 0, 80, 160 ou 480 ppm de carboxine chez les femelles. Cela correspond à des expositions de 0 ; 5,5 ; 10,5 ou 16,1 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 6,0 ; 12,1 ou 37,0 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique est une augmentation statistiquement significative de l'incidence d'une néphropathie progressive chronique chez les mâles. La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 160 ppm et 80 ppm chez les rats mâles.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les mâles de 5,5 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,055 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.4.2.1.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité subchronique.

Les lésions rénales sont retrouvées également dans l'étude de toxicité répétée par voie cutanée chez les rats mâles (28 jours) et dans l'étude sur 2 générations chez les rats mâles et femelles de la génération parentale.

Un niveau de confiance global **moyen-fort** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études ont été conduites à 28 et 90 jours chez plusieurs espèces pour les deux sexes (rat et chien).
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : des atteintes rénales (néphrite/néphropathie, atteintes tubulaires) sont retrouvées de façon statistiquement significative dans cette étude sur 90 jours chez le rat ainsi que dans d'autres études (28 jours par voie cutanée et étude sur 2 générations chez le rat). Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas précisé.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude retenue réalisée chez le rat, par voie orale, pour une durée de 90 jours est de bonne qualité : 10 animaux par dose et par sexe, outre le témoin négatif, 3 doses relativement rapprochées.
- **le choix du point de départ** : les doses d'exposition permettent de déterminer un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 13 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour la carboxine

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Lésions rénales (néphropathie chronique) (étude 90 jours chez le rat)	5,5	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,055	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			

6.4.2.2 DJA

6.4.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse (OCDE 453), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 20, 200 ou 400 ppm de carboxine chez les mâles ou 0, 20, 300 ou 600 ppm de carboxine chez les femelles pendant 102 semaines. Cela correspond à des expositions de 0 ; 0,82 ; 8,65 ou 16,86 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,05 ; 15,68 ou 33,48 mg/kg pc/j pour les femelles. Dix animaux par sexe et par dose ont été sacrifiés après 52 semaines. Cette étude a été arrêtée après la 102^{ème} semaine de traitement en raison d'un taux de survie à 27% dans le groupes des mâles exposés à 400 ppm.

Selon l'Etat-membre rapporteur du DAR (Drug Assessment Report) initial (UK, 2006), les effets critiques sont une augmentation de l'incidence des hyperplasies parathyroïdiennes et des ostéodystrophies (à la limite de la significativité statistique à 20 ppm, P=0,09 et P=0,11, respectivement, Test exact de Fisher) chez les mâles. La LOAEL pour ces effets critiques est de 20 ppm qui est la plus faible dose testée. Le mode d'action suspecté passerait par une insuffisance rénale chronique responsable d'une hyperphosphatémie et d'une altération de l'homéostasie calcique. Ces 2 altérations entraîneraient une hyperparathyroïdie, avec hypersecrétion de parathormone, favorisant alors l'ostéodystrophie.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la LOAEL de 0,82 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 500 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain, 5 pour tenir compte de l'extrapolation LOAEL-NOAEL), la DJA établie par l'Etat-membre rapporteur est de 0,0016 mg/kg pc/j.

Après prise en compte des contrôles historiques, la LOAEL de 20 ppm proposée dans le DAR initial a été reconsidérée en NOAEL par l'EFSA (2010). Ainsi, le point de départ pour l'élaboration de la DJA en vigueur est la NOAEL chez les mâles de 0,82 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), la DJA établie est de 0,008 mg/kg pc/j.

6.4.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Les experts du GT considèrent que les contrôles historiques ne doivent pas être utilisés pour remettre en cause la pertinence des effets retrouvés. La comparaison avec le contrôle de

l'étude reste la plus appropriée. Ainsi, le GT considère que l'augmentation de l'incidence des hyperplasies parathyroïdiennes et des ostéodystrophies, même à la limite de la significativité statistique, doit être pris en compte pour établir la LOAEL à 20 ppm. De plus, une tendance à l'élévation du nombre de kystes ovariens est également observée dès 20 ppm (1,05 mg/kg pc/j), à la limite de la significativité statistique à la dose de 300 ppm (15,68 mg/kg pc/j) (P=0,07, Test exact de Fisher).

Le GT préconise donc de baser la DJA sur une LOAEL de 0,82 mg/kg pc/j avec un facteur d'incertitude de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour l'extrapolation LOAEL-NOAEL), ce qui aboutit à une valeur de 0,0027 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : les études de toxicité chronique ont été conduites chez plusieurs espèces pour les deux sexes (2 ans chez le rat, 18 mois chez la souris et 1 an chez le chien).
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est l'augmentation des hyperplasies parathyroïdiennes et d'ostéodystrophies du fémur, en particulier chez les mâles, dès la plus faible dose utilisée (proche de la significativité statistique). Le mode d'action suspecté impliquerait que l'insuffisance rénale chronique serait responsable d'une hyperphosphatémie et d'une altération de l'homéostasie calcique. Ces 2 altérations entraîneraient une hyperparathyroïdie, avec hypersecrétion de parathormone, favorisant alors l'ostéodystrophie. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude retenue réalisée chez le rat, par voie orale, pour une durée de 2 ans est jugée de bonne qualité : 60 animaux par sexe et par dose ; outre le témoin, 3 doses relativement rapprochées ont été testées.
- **le choix du point de départ** : seule une LOAEL a été déterminée.

Tableau 14 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour la carboxine

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Ostéodystrophie fibreuse du fémur et hyperplasie parathyroïdienne (étude 2 ans chez le rat)	0,82	100	0,008	Idem dossier réglementaire	Remise en cause de la NOAEL de 0,82 mg/kg pc/j en LOAEL	300	0,0027 Moyen

6.4.2.3 ARfD

6.4.2.3.1 Description de l'ARfD

Selon l'EFSA (2010), le profil toxicologique de la carboxine ne justifie pas la détermination d'une ARfD. Aucune ARfD n'est donc fixée actuellement.

6.4.2.3.2 Analyse critique du GT

Le GT note que le DAR initial fixe une ARfD à 0,055 mg/kg pc/j sur la base de néphropathies chroniques retrouvées chez les rats mâles dans une étude de 90 jours (détails de cette étude dans la partie relative à l'AOEL).

Le point de départ pour l'élaboration de cette ARfD était la NOAEL chez les mâles de 5,5 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie était de 0,055 mg/kg pc/j.

En raison de la non réapprobation de la carboxine, le GT n'a pas jugé pertinent de proposer une nouvelle ARfD.

6.4.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Mutagenèse

Le DAR initial (2006) conclut à des résultats équivoques quant au potentiel mutagène de la carboxine. En effet, 2 sur 4 tests réalisés *in vitro* et 1 sur 2 tests réalisés *in vivo* se sont révélés positifs ou équivoques.

S'agissant des tests *in vitro*, le test d'Ames (sur *S. typhimurium*) rapporte des résultats négatifs, en présence et en absence d'inducteurs enzymatiques (S9). Le test de mutagénicité sur cellules de mammifères (test HGPRT¹⁴ sur cellules ovariennes de hamster chinois (CHO)) s'est lui aussi montré négatif (avec ou sans S9). Le test de clastogénicité mené sur ces mêmes cellules CHO montre quant à lui une positivité en présence de S9, lors de 2 tests indépendants successifs, avec une augmentation significative du nombre de cassures chromosomiques et chromatiniennes pour des doses s'accompagnant d'une cytotoxicité notable. Enfin, le test de réparation des dommages à l'ADN (*Unscheduled DNA synthesis* ou UDS) mené dans des hépatocytes primaires de rat montre une positivité à des concentrations modérées non cytotoxiques. Deux tests de clastogénicité *in vivo* menés chez le rat montrent des résultats équivoques : une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse des rats traités, mais l'absence de significativité statistique et de relation dose-effet ne permet pas de conclure. Un test UDS dans des hépatocytes primaires isolés à partir de foie de rats traités à la carboxine, s'est révélé négatif.

En conséquence, l'EFSA en 2010 et l'ECHA en 2017 (dans le cadre du règlement CLP) ont considéré que, *in vivo*, la carboxine ne possède pas de potentiel clastogène ni génotoxique.

Une analyse de la bibliographie par le GT a permis de mettre en évidence une étude *in vivo* non présente dans le dossier réglementaire (Adhikari et Graver 1988). Cette étude montre un effet clastogène de la carboxine sur la moelle osseuse de rats traités par une dose unique de 191 mg/kg pc. Ces effets sont statistiquement significatifs avec une relation dose-effet.

Les experts du GT soulignent que la classification de la carboxine comme non mutagène devrait être ré-évaluée, compte tenu des différents tests positifs à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Cancérogenèse

Des études de cancérogenèse ont été menées sur 2 ans chez le rat et 19 mois chez la souris.

¹⁴ Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase

Dans l'étude de 2 ans chez le rat décrite dans la section relative à l'élaboration de la DJA, il est rapporté une augmentation non statistiquement significative de l'incidence des carcinomes hépatocellulaires (HCC) chez les mâles à la plus forte dose testée de 400 ppm (16,86 mg/kg pc/j). Néanmoins, cette augmentation (8%) d'HCC est nettement supérieure aux taux retrouvés dans les contrôles historiques fournis par les industriels (moyenne : 0,9%, intervalle : 0 – 1,7%).

Dans l'étude sur 19 mois chez la souris, 50 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 50, 2500 ou 5000 ppm, correspond à des expositions de 0 ; 8 ; 385 ou 752 mg/kg pc/j chez les mâles et 0 ; 9 ; 451 ou 912 mg/kg pc/j chez les femelles. L'incidence des HCC n'est pas significativement augmentée dans cette étude. Cependant, il est rapporté une augmentation statistiquement significative de l'incidence des adénomes pulmonaires chez les mâles (34% à la dose de 5000 ppm) (P=0,05, Test exact de Fisher).

Au vu de ces effets néoplasiques chez le rat et la souris, la conclusion du DAR initial (2006), confirmée par l'EFSA (2010), a été de proposer une classification en tant que cancérigène de catégorie 3, R40 selon la directive n°67/548/CEE sur les substances dangereuses¹⁵ pour la carboxine, c'est-à-dire ayant « un effet cancérigène suspecté ». En 2017, arguant principalement (i) de l'absence d'effet chez les rates, (ii) de l'absence de significativité statistique chez le rat et (iii) des effets toxiques concomitants importants à 400 ppm chez les rats mâles (survie réduite, poids réduit, signes cliniques de toxicité), le comité d'évaluation des risques (CER ou RAC en anglais) de l'ECHA¹⁶ a conclu que l'augmentation de la fréquence de ces HCC n'était pas pertinente pour justifier un classement selon le règlement CLP. De même, les adénomes pulmonaires retrouvés chez les souris mâles ont été considérés comme non reliés au traitement par la carboxine, en raison notamment d'une spécificité de sexe et d'une incidence dont le taux était assez proche de la limite supérieure retrouvée dans les contrôles historiques. Au final, le RAC, contrairement à l'EFSA, a conclu que ces données n'étaient pas suffisantes pour classer la carboxine comme un potentiel agent cancérigène selon le règlement CLP.

Au vu des effets observés, et en particulier chez la souris (augmentation statistiquement significative des adénomes pulmonaires), les experts du GT ne sont pas en accord avec les conclusions du RAC.

Effets sur la thyroïde et les parathyroïdes

Il est à noter qu'une augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif de la thyroïde et des parathyroïdes a été constatée dans l'étude de 90 jours à la dose de 37 mg/kg pc/j (480 ppm) chez les femelles. Cet effet a également été retrouvé de façon statistiquement significative dans l'étude de toxicité orale subchronique à 30 jours chez le chien mâle à la dose de 19,3 mg/kg pc/j (600 ppm).

6.5 Cyflumetofen

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2010 & 2021), des conclusions de l'EFSA (2012 & 2016), des conclusions du JMPR (2014) et de l'opinion du RAC (2017).

¹⁵ Cette directive a été remplacée par le règlement CLP. Selon le tableau de conversion disponible dans l'annexe VII du règlement CLP, cette classification équivaudrait à une classification en tant que cancérigène de catégorie 2 (susceptible de provoquer le cancer) selon le règlement CLP.

¹⁶ Agence européenne des produits chimiques (European chemicals agency)

De plus, plusieurs rapports d'études ont été consultés, incluant des études de toxicité répétée, des études de toxicité sur le développement prénatal et des études de perturbation endocrinienne.

Une publication portant sur le mode d'action et la sélectivité du cyflumetofen a été identifiée (Hayashi et al. 2013). Une étude de toxicité sur 90 jours présentée dans le dossier réglementaire a également été publiée (Yoshida et al. 2012).

6.5.1 Partie toxicocinétique

Le mode d'action SDHI du cyflumetofen passe par son métabolite AB-1 ((RS)-2-(4-tert-butylphenyl)-3-oxo-3-(α,α,α -trifluoro-*o*-tolyl)propiononitrile), obtenu après hydrolyse puis décarboxylation, qui porte l'action inhibitrice de la SDH (Hayashi et al. 2013).

Pour les études de toxicocinétique, le cyflumetofen est marqué au ^{14}C sur le cycle A ou B. Des rats mâles et femelles sont exposés à une dose unique à faible dose (3 mg/kg pc) ou à forte dose (250 mg/kg pc). Le pourcentage d'absorption du cyflumetofen est de 61-67% à faible dose et de seulement 15-26% à forte dose après 72 h. Le C_{max} plasmatique à faible dose est d'environ 1 $\mu\text{g eq/g}$ de tissu et à forte dose entre 10 et 15 $\mu\text{g eq/g}$ de tissu. Le T_{max} est d'1 heure à faible dose et de 2 à 4 heures à forte dose pour le marquage sur le cycle A. Il est d'1 heure pour la faible dose et 2 heures pour la forte dose pour le marquage sur le cycle B.

Le cyflumetofen et/ou ses métabolites sont largement distribués dans tous les tissus. Pour la distribution, les plus fortes concentrations sont retrouvées dans le foie et les reins respectivement à des niveaux supérieurs de 12 et 4 fois aux concentrations plasmatiques après 24 heures. Avec le cyflumetofen marqué en cycle A, des concentrations plus élevées que dans le plasma sont observées dans les érythrocytes (à la forte dose), le tissu adipeux, la moelle et les glandes surrénales. Avec le marquage en cycle B, des concentrations plus élevées que dans le plasma sont observées dans les érythrocytes et les glandes surrénales (à forte dose). Cela est à mettre en lien avec les effets délétères du cyflumetofen observés dans toutes les espèces animales sur les glandes surrénales.

La demi-vie d'élimination va de 12 heures à 17 heures pour le marquage sur le cycle A et entre 17 heures et 22 heures pour le marquage sur le cycle B. Le cyflumetofen est éliminé dans l'urine à faible dose (58-67%) et par les fèces à forte dose (68-80%) après 72 heures. L'absorption et l'excrétion de la radioactivité dans l'urine sont plus élevées chez les rats femelles que chez les rats mâles pour les 2 doses.

Une étude distincte a été réalisée sur des rats ayant une canule dans le canal biliaire, aux mêmes niveaux de dose. D'après la radioactivité récupérée dans l'urine, la bile, les tissus et la carcasse résiduelle, l'absorption orale est de 68-78% pour la faible dose et de 35-46% pour la forte dose, sans différence entre les sexes. L'absorption de 68% est prise en compte lors du calcul de l'AOEL.

Enfin, il existe une étude de pharmacocinétique réalisée chez la souris, postérieure au DAR mais détaillée dans le rapport du JMPR (2014). Les doses orales testées sont de 0, 50, 250 et 1000 mg/kg pc/j avec un radio marquage sur son cycle B. L'absorption est rapide par le tractus gastro-intestinal, avec une concentration plasmatique maximale à 0,5-1,0 heure. L'absorption est plus importante chez les femelles. L'évolution temporelle de la radioactivité diffère entre les deux sexes : les femelles présentent une seconde C_{max} de 2 ou 8 heures après l'administration. Une absorption plus élevée du cyflumetofen et une recirculation entéro-hépatique chez les femelles conduisent à des doses internes plus élevées par rapport aux mâles.

6.5.2 Revue des valeurs de référence

6.5.2.1 AOEL

6.5.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de 90 jours (OCDE 408), conduite chez le rat par voie orale, ainsi qu'une étude de cancérogénicité sur deux ans (OCDE 451), conduite chez le rat par voie orale.

Dans l'étude de 90 jours, des groupes de 10 animaux par sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 300, 1000 ou 3000 ppm de cyflumetofen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 5,4 ; 16,5 ; 54,5 ou 167 mg/kg pc/j chez les mâles et 0 ; 6,28 ; 19,0 ou 193 mg/kg pc/j chez les femelles.

Les effets critiques sont des altérations des corticosurrénales (vacuolisation chez les mâles et hypertrophie du cortex surrénalien chez les femelles) et ovariennes (vacuolisation interstitielle). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 et 300 ppm chez les rats des deux sexes. Cette étude a été publiée par Yoshida et al. 2012.

Dans l'étude de cancérogénicité, des groupes de 50 animaux par sexe ont consommé des aliments contenant 0, 150, 500 ou 1500 ppm de cyflumetofen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 4,9 ; 16,5 ou 49,5 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 6,1 ; 20,3 ou 61,9 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont une hypertrophie du cortex surrénalien et une dilatation des structures utérines¹⁷. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1500 et 500 ppm pour les rats des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 17 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction de l'absorption par voie orale de 68%, l'AOEL établie est de 0,11 mg/kg pc/j.

6.5.2.1.2 *Analyse critique du GT*

Le GT a identifié une étude sur deux générations (OCDE 416) dans le dossier réglementaire. Il considère que cette étude conduite chez le rat par voie orale, doit être prise en compte dans l'élaboration de l'AOEL.

Dans cette étude, des groupes de 24 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 150, 500 ou 1500 ppm de cyflumetofen correspondant à 0 ; 10,4 ; 34,6 ou 100,3 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 12,0 ; 39,7 ou 121,6 mg/kg pc/j pour les femelles, sur la base de la consommation alimentaire des animaux de la génération parentale avant l'accouplement.

Une augmentation statistiquement significative du poids des surrénales et des changements de coloration des surrénales ainsi qu'une hypertrophie et une vacuolisation des cellules du cortex surrénalien sont observés chez les femelles dès 500 ppm. La NOAEL pour la génération parentale est de 150 ppm. Ces signes se retrouvent chez les générations F1 et F2, également à la dose de 500 ppm (pour les mâles), accompagnés d'un retard de maturité sexuelle. La NOAEL développementale est donc de 150 ppm.

Le GT recommande de prendre l'étude de reproduction sur 2 générations comme étude clé pour la dérivation de l'AOEL. Il s'agit de l'étude présentant la plus faible NOAEL pour des études de durée subchronique. Cette NOAEL établie à 10 mg/kg pc/j est inférieure à la NOAEL (17 mg/kg pc/j) servant actuellement de base à l'AOEL. Elle se base sur l'observation d'effets

¹⁷ "luminal dilatation of the gland in the uterine horn"

sur les surrénales qui sont rapportés de façon cohérente dans la plupart des études réalisées avec le cyflumetofen. Le mode d'action proposé dans le dossier réglementaire serait une inhibition de la lipase hormonosensible et une inhibition de la stéroïdogénèse.

Ainsi, l'AOEL serait révisée à 0,07 mg/kg pc/j (au lieu de 0,11 mg/kg pc/j), en prenant en compte un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et une absorption orale à 68%.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : de nombreuses études ont été conduites chez plusieurs espèces (rat, chien et souris). Plusieurs études ont des durées pertinentes pour la détermination de l'AOEL.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets sur les corticosurrénales retenus comme effets critiques sont observés dans l'étude clé et également dans les 14 études de toxicologie réalisées dans 4 espèces différentes. La majorité montrent des effets sur les surrénales. Quelques études chez le rat montrent des niveaux de doses similaires (10,4, 16,5, 17,4, 18,8, 49,5, 50 mg/kg pc/j). Cette pathologie est pertinente pour l'humain. Le mode d'action proposé dans le dossier réglementaire serait une inhibition de la lipase hormonosensible et une inhibition de la stéroïdogénèse.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude sur 2 générations chez le rat est retenue comme étude clé. Cette étude est d'une durée adaptée à la dérivation d'une AOEL.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL. La NOAEL est plus faible que celle retenue comme point de départ dans le dossier réglementaire.

Tableau 15 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Altérations des corticosurrénales et des ovaires (études 90 jours et 2 ans chez le rat)	17	100 (68%)	0,11	Altération des corticosurrénales (étude sur 2 générations chez le rat)	10	100 (68%)	0,07 Moyen

6.5.2.2 DJA

6.5.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de 90 jours (OCDE 408), conduite chez le rat par voie orale, ainsi qu'une étude de cancérogénicité sur deux ans (OCDE 451), conduite chez le rat par voie orale.

Dans l'étude de 90 jours, des groupes de 10 animaux par sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 300, 1000 ou 3000 ppm de cyflumetofen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 5,4 ; 16,5 ; 54,5 ou 167 mg/kg pc/j chez les mâles et 0 ; 6,28 ; 19,0 ou 193 mg/kg pc/j chez les femelles.

Les effets critiques sont des altérations des corticosurrénales (vacuolisation chez les mâles et hypertrophie du cortex surrénalien chez les femelles) et ovariennes (vacuolisation interstitielle). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 et 300 ppm chez les rats des deux sexes. Cette étude a été publiée par Yoshida et al. 2012.

Dans l'étude de cancérogénicité, des groupes de 50 animaux par sexe ont consommé des aliments contenant 0, 150, 500 ou 1500 ppm de cyflumetofen, ce qui correspond à des expositions de 0 ; 4,9 ; 16,5 ou 49,5 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 6,1 ; 20,3 ou 61,9 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont une hypertrophie du cortex surrénalien et une dilatation des structures utérines. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1500 et 500 ppm pour les rats des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL de 17 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), la DJA établie est de 0,17 mg/kg pc/j.

6.5.2.2.2 Analyse critique du GT

Le GT a identifié une étude sur deux générations (OCDE 416) dans le dossier réglementaire. Il considère que cette étude conduite chez le rat par voie orale, doit être prise en compte dans l'élaboration de la DJA.

Dans cette étude, des groupes de 24 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 150, 500 ou 1500 ppm de cyflumetofen correspondant à 0 ; 10,4 ; 34,6 ou 100,3 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 12,0 ; 39,7 ou 121,6 mg/kg pc/j pour les femelles, sur la base de la consommation alimentaire des animaux de la génération parentale avant l'accouplement.

Dans l'étude sur 2 générations chez le rat, une augmentation statistiquement significative du poids des surrénales et des changements de coloration des surrénales ainsi qu'une hypertrophie et vacuolisation des cellules du cortex surrénalien sont observés chez les femelles dès 500 ppm. La NOAEL de la génération parentale est de 150 ppm. Ces signes se retrouvent chez les générations F1 et F2, également à la dose de 500 ppm (pour les mâles), accompagnés d'un retard de maturité sexuelle. La NOAEL développementale est donc de 150 ppm.

Le GT recommande de prendre l'étude de reproduction sur 2 générations comme étude clé pour la dérivation de la DJA. Il s'agit de l'étude présentant la plus faible NOAEL pour des études de durée subchronique et chronique. Cette NOAEL établie à 10 mg/kg pc/j est inférieure à la NOAEL (17 mg/kg pc/j) servant actuellement de base à la DJA. Elle se base sur l'observation d'effets sur les surrénales qui sont rapportés de façon cohérente dans la plupart des études réalisées avec le cyflumetofen. Le mode d'action proposé dans le dossier réglementaire serait une inhibition de la lipase hormonosensible et une inhibition de la stéroïdogenèse.

Ainsi, le point de départ pour l'élaboration de la DJA proposée par le GT serait la NOAEL de 10 mg/kg pc/j. Après application avec un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle, chez l'humain), la DJA serait révisée à 0,10 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : de nombreuses études conduites chez plusieurs espèces, respectant les lignes directrices de l'OCDE, sont disponibles. Des expériences complémentaires auraient pu être conduites pour mieux caractériser les effets sur la stéroïdogénèse *in vitro*.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets sur les corticosurrénales retenus comme effets critiques sont observés dans l'étude clé et également dans les 14 études de toxicologie réalisées dans 4 espèces différentes. Cette pathologie est pertinente pour l'humain. Le mode d'action proposé dans le dossier réglementaire serait une inhibition de la lipase hormonosensible et une inhibition de la stéroïdogénèse.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude 2 générations chez le rat est retenue comme étude clé. Cette étude est d'une durée adaptée à la dérivation d'une DJA.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL. La NOAEL est plus faible que celle retenue comme point de départ dans le dossier réglementaire.

Tableau 16 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA actuelle (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Altération des corticosurrénales et des ovaires (étude 90 jours et 2 ans chez le rat)	17	100	0,17	Altération des corticosurrénales (étude sur 2 générations chez le rat)	10	100	0,1 Moyen

6.5.2.3 ARfD

6.5.2.3.1 Description de l'ARfD

A ce jour, il n'y a pas d'ARfD établie.

6.5.2.3.2 Analyse critique du GT

Étant donné les effets observés dans l'étude de toxicité prénatale, le GT considère qu'une ARfD doit être fixée.

Dans cette étude, des groupes de 25 femelles ont reçu 0, 50, 250 ou 1000 mg/kg pc/j de cyflumetofen par gavage du 6^{ème} au 19^{ème} jour de leur gestation (OCDE 414).

L'effet critique est un retard d'ossification au niveau du sternum (statistiquement significatif) chez les fœtus (9/315 et 9/305 fœtus aux doses de 250 et 1000 mg/kg pc/j, respectivement). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 250 mg/kg pc/j et 50 mg/kg pc/j chez les rats, respectivement. L'étude choisie permet de souligner également les troubles du développement oculaire qui ont été identifiés à la dose la plus faible (mais non significatifs) (voir points d'attention).

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 50 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,5 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études conduites chez plusieurs espèces (rat, lapin), respectant les lignes directrices de l'OCDE, sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : le retard d'ossification révèle un retard de développement lié au traitement. Cet effet étant réversible, il n'est pas considéré comme tératogène. Cet effet est transposable à l'humain. Le mode d'action est partiellement connu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est d'une durée adaptée à la dérivation d'une ARfD.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL pour le développement. Il est à constater que la NOAEL maternelle de cette étude est également de 50 mg/kg pc/j pour les effets d'hypertrophie et de vacuolisation des cellules surrénaliennes.

Tableau 17 : Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le cyflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD actuelle (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Non dérivée				Retard d'ossification (étude de toxicité prénatale chez le rat)	50	100	0,5 Moyen

Une position divergente concernant l'ARfD retenue par le GT pour le cyflumetofen est présentée en annexe.

6.5.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Toxicité sur le développement oculaire

Dans l'étude de tératogénicité chez le rat, les auteurs du rapport d'étude ne commentent pas l'apparition de deux malformations oculaires majeures et irréversibles, signe d'une organogénèse perturbée (Tableau 18 : Occurrence des malformations oculaires chez le rat Br/Han:WIST@Tac(GALAS) dans l'étude de toxicité prénatale (0, 50, 250 et 1000 mg/kg pc/j) et dans les données de contrôles historiques de l'éleveur.). La rétine est un tissu dans lequel la voie du succinate est majoritaire, suggérant que ce tissu serait particulièrement sensible aux inhibiteurs de la SDH (Bisbach et al. 2020; Hass et al. 2022) (cf. section 0). En effet, sur des fœtus de rat, l'évaluation des globes oculaires et l'analyse de la structure rétinienne nécessite

une approche spécifique en raison de la taille des structures et des paupières closes. En l'absence d'étude plus poussée et spécifique, il est donc probable de passer à côté de ces malformations et de sous-estimer leur occurrence. De plus, des travaux antérieurs portant sur les malformations spontanées dans la souche Wistar Hannover GALAS rats ne rapportent pas de microphthalmie ou de replis rétiniens (Aoyama et al. 2002). De même, ces malformations ne sont pas répertoriées par l'éleveur Taconic dont sont issus les rats de cette étude, suggérant la rareté de ces malformations spontanées¹⁸.

Tableau 18 : Occurrence des malformations oculaires chez le rat BrIHan:WIST@Tac(GALAS) dans l'étude de toxicité prénatale (0, 50, 250 et 1000 mg/kg pc/j) et dans les données de contrôles historiques de l'éleveur.

	Dose (mg/kg pc/j)				Contrôles historiques de l'éleveur
	0	50	250	1000	
Microphthalmie	0/293	1/288	0/315	0/305	0/787
Replis rétinien	0/293	1/288	0/315	0/305	0/787

Par précaution et à la vue des effets oculaires observés avec d'autres SDHI, le GT a envisagé de considérer la valeur de 50 mg/kg pc/j comme une LOAEL pour établir une ARfD. Cependant ces effets sont observés uniquement à la dose la plus faible et ne ressortent pas significatif à l'analyse statistique, le groupe contrôle étant vierge de toute malformation oculaire (Tableau 18 : Occurrence des malformations oculaires chez le rat BrIHan:WIST@Tac(GALAS) dans l'étude de toxicité prénatale (0, 50, 250 et 1000 mg/kg pc/j) et dans les données de contrôles historiques de l'éleveur.). Des investigations supplémentaires de la taille des globes oculaires, ainsi qu'une étude de neurotoxicité du développement, permettraient de clarifier la pertinence de ces effets (cf. recommandations).

Toxicité des métabolites du cyflumetofen

Métabolite AB-1 : responsable de l'action inhibitrice du cyflumetofen sur la SDH

Le métabolite actif du cyflumetofen est le métabolite AB-1. Il a une action inhibitrice de la SDH supérieure à la molécule mère, et par ce biais, est neurotoxique pour les acariens (Hayashi et al. 2013).

On peut déplorer l'absence de cette information dans le volume 3B6 du dossier réglementaire pour plusieurs raisons :

- Ce métabolite n'est pas suivi en terme de toxicocinétique dans les études d'ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination). Son accumulation dans certains organes, notamment les cortico-surrénales, pourrait expliquer la toxicité observée.
- Ce métabolite étant majoritairement actif, sa production au sein des organismes mammifères devrait être suivie pour évaluer la toxicité de la substance mère. En effet, l'hydrolyse et la décarboxylation/ dé-estérification est un processus pertinent chez l'humain.
- La réalisation d'une étude de toxicité chez le rat et la souris pendant 90 jours sur ce métabolite en particulier aurait été justifiée pour établir le profil toxicologique du métabolite actif du cyflumetofen.

¹⁸

https://info.taconic.com/hs-fs/hub/355513/file-2458727415-pdf/Technical_Library/Wistar_Hannover_data.pdf

Néanmoins, ce métabolite apparaît dans le schéma métabolique fourni dans le dossier réglementaire.

A partir des données sur la molécule-mère radiomarquée, la radioactivité s'accumule particulièrement dans le foie, les reins et les cortico-surrénales. Le métabolite actif AB-1 libre et conjugué est retrouvé essentiellement dans la bile, mais aussi les métabolites-fils AB-3 (libre dans les urines et conjugué dans la bile) et AB-2 (libre dans les urines et la bile). Ces mesures traduisent donc le fait qu'il y aurait bien une production du métabolite actif du cyflumetofen, pouvant exercer alors des effets d'inhibition de la SDH.

Métabolite B3 et risque environnemental

Le métabolite B3 (2-(trifluorométhyl)benzamide) est un métabolite du cyflumetofen, retrouvé dans l'eau de surface, les sols et sédiments. Selon l'EFSA (2016), le potentiel génotoxique de ce métabolite ne peut être exclu. Les concentrations prévisibles dans les eaux souterraines pour ce métabolite dépassant le seuil réglementaire de 0,1 µg/l pour l'ensemble des scénarios évalués au niveau européen ont conduit à n'autoriser le cyflumetofen que pour des usages sous abri hors-sol.

Analyse des effets susceptibles d'être expliqués par un mécanisme perturbateur endocrinien

Le GT a identifié un nombre conséquent d'études réglementaires montrant des altérations des corticosurrénales dans les 4 espèces testées (rat, souris, chien, lapin), peu importe la durée d'exposition. En accord avec le GT, les conclusions de l'EFSA (2016) recommandent des discussions approfondies sur le potentiel de perturbation endocrinienne du cyflumetofen.

6.6 Fluopyram

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2011), des conclusions de l'EFSA (2013) et de l'opinion du RAC (2014). De plus, plusieurs rapports d'études inclus dans le dossier réglementaire, ont été consultés, incluant les études de neurotoxicité aiguë, les études sur 90 jours et les études de cancérogénicité. Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.6.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, le fluopyram est marqué au ¹⁴C sur le noyau ([phenyl-UL-14C]fluopyram et [pyridyl-2,6-14C]fluopyram). Au total cinq études ont été réalisées : deux études d'ADME et deux études quantitatives d'autoradiographie du corps entier ainsi qu'une étude de déplétion organique avec le [pyridyl-2,6-14C]fluopyram. Elles sont réalisées chez le rat *via* une exposition unique de 5 ou 250 mg/kg pc par gavage dans une suspension aqueuse de 0,5% de tragacathe.

Une absorption de plus de 93 % est trouvée dans les 48 heures post-exposition. Les demi-vies d'absorption sont de l'ordre de 0,1 - 0,5 heures [Phényle] et de 0,3 - 0,4 heures [Pyridyle]. Le Tmax varie de 11 à 15 heures. Le Cmax varie entre 1,5 et 2,2 µg eq/g de tissu à 5 mg/kg pc et de 61 à 62 µg eq/g de tissu à 250 mg/kg pc.

Les voies d'excrétion sont légèrement différentes selon le marquage. Lorsque le fluopyram est marqué sur le cycle phényle, l'excrétion dans les fèces représente entre 47 % et 64 %, tandis que l'excrétion rénale varie de 35 % à 45 % chez les deux sexes. Avec le marquage pyridyle,

l'excrétion est de 53 % dans les fèces et de 45 % dans les urines chez les rats mâles, mais de 39 % dans les fèces et de 60 % dans les urines chez les femelles. L'exhalation est négligeable dans tous les essais de pharmacocinétique.

Des rats mâles ayant subi une canulation biliaire montrent que 61 % de la dose administrée est excrétée par la bile dans les 24 heures suivant l'administration. Enfin, le composé marqué au [phenyl-UL-¹⁴C], montre une excrétion urinaire (7,3 %) et biliaire (78,5 %) et dans la carcasse (7,6 %). Ces pourcentages sont plus importants avec le composé marqué au [pyridyl-2,6-¹⁴C].

Une large distribution de la radioactivité est retrouvée dans l'organisme. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le foie et les reins (avec le marquage phényle) et dans les érythrocytes (avec le marquage pyridyle). Des résidus élevés sont également retrouvés dans la glande de Harder, les surrénales, la thyroïde, le tissu adipeux et les ovaires. Les noyaux pyridyle et phényle se séparent lors d'une étape de métabolisation du composé parent.

Chez le rat, le fluopyram est très métabolisé par les enzymes de phase I (hydroxylation, oxydation et clivage moléculaire donnant un dérivé benzamide), suivi d'une conjugaison (phase II) avec le glutathion, l'acide glucuronique ou le sulfate. On dénombre 26 métabolites résultant de ces processus mais ceux-ci ne sont présents qu'en faibles quantités. Les métabolites les plus abondants sont le benzamide de fluopyram, l'acide pyridylacétique de fluopyram, le 7-OH-phénol de fluopyram, le 7- ou 8-OH de fluopyram et le glucuronide d'éthylidol de fluopyram représentant chacun 6 à 28 % de la dose administrée. Le composé parent ne représente, à la fin de l'expérimentation (168 heures) dans les fèces, que 0,4 % à 1,2 % de la dose administrée.

Trois principaux groupes de métabolites (avec dans chacun, deux isomères des conjugués de l'acide glucuronique fluopyram-7-OH-GA, -8-OH-GA et éno-GA) sont retrouvés dans la bile. Après élimination biliaire, les métabolites conjugués sont clivés dans l'intestin grêle puis ces métabolites déconjugués sont en partie excrétés dans les fèces, et l'autre partie, réabsorbée.

6.6.2 Revue des valeurs de référence

6.6.2.1 AOEL

6.6.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de 90 jours (OCDE 408), conduite chez la souris par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 30, 150 ou 1000 ppm de fluopyram, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 5,4 ; 26,6 ou 188 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 6,8 ; 32 ou 216 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique est une augmentation statistiquement significative du poids relatif du foie, accompagnée de changements biochimiques (diminutions statistiquement significatives du cholestérol et de la bilirubine dans les deux sexes et diminutions statistiquement significatives des protéines totales et de l'albumine chez les mâles) et histopathologiques (hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 150 ppm et 30 ppm chez les souris des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les mâles de 5,4 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,05 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.6.2.1.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, après obtention des rapports complets de cette étude et de l'étude équivalente chez le rat.

Même s'il existe chez les souris mâles traitées à la plus faible dose testée, une diminution significative du cholestérol total, celle-ci est isolée et ne présente donc pas de pertinence biologique. Ainsi, la VTR est basée sur la NOAEL la plus faible parmi les études subchroniques.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : Plusieurs études de toxicité subchroniques sont disponibles. Cependant, les données sont résumées extrêmement succinctement dans le volume 3B6 (pas de données d'anatomopathologie autres qu'hépatique, pas de test statistique sur les effets histologiques hépatiques, pas de données de biochimie) et les détails ne sont pas toujours retrouvés dans les rapports d'études consultés.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est basé principalement sur des hypertrophies des hépatocytes centrolobulaires à la dose de 26,6 mg/kg pc/j chez la souris mâle. Le GT note qu'une augmentation statistiquement significative du poids relatif et absolu du foie (sans anomalie histologique) est rapporté chez les femelles dès 6,8 mg/kg pc/j. Des effets hépatiques (augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif du foie, associée à une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires) sont également observés dans une étude de 90 jours chez le rat à des doses plus élevées (1000 ppm soit 60,5-70,1 mg/kg pc/j). Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas précisé.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est résumée de manière très sommaire dans le DAR et les détails ne sont pas toujours retrouvés dans le rapport d'étude. En raison de ces éléments, le GT a eu des difficultés à se prononcer de façon formelle sur cette étude. Elle est néanmoins d'une durée adaptée pour élaborer une AOEL.
- **le choix du point de départ** : dans cette étude, il existe un couple NOAEL / LOAEL.

Tableau 19 : Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets hépatiques (incluant des effets sur le poids, sur la biochimie et en histologie) (étude 90 jours chez la souris)	5,4	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : faible			

6.6.2.2 DJA

6.6.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (OCDE 453), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé, pendant 104 semaines, des aliments contenant 0, 30, 150 ou 750/375 ppm de fluopyram chez les mâles ou 0, 30, 150 ou 1500 ppm chez les femelles. Cela correspond à des expositions de 0 ; 1,2 ; 6,0 ou 29 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,68 ; 8,6 ou 89 mg/kg pc/j pour les femelles. Concernant le groupe de mâles exposés à la 750 ppm de fluopyram, cette dose a été diminuée à la 85^{ème} semaine pour une dose de 375 ppm jusqu'à la 104^{ème} semaine.

Les effets critiques sont les suivants :

- une augmentation statistiquement significative du poids absolu du foie, associée à des changements biochimiques et histologiques (hypertrophie, foyers éosinophiles),
- des lésions histologiques de la thyroïde : hypertrophie folliculaire et altération de la colloïde,
- des anomalies histologiques des reins (hypertrophie et dilatation tubulaire, néphropathie chronique progressive, gouttelettes hyalines) chez les rats mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 150 ppm et 30 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 1,2 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,012 mg/kg pc/j.

6.6.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Cette étude montre une mortalité totale inexplicée observée en cours d'étude (270 animaux sur 560, soit 48%). Cette mortalité est considérée, dans le rapport d'évaluation européenne, comme significativement liée au traitement chez les mâles à la plus haute dose. La mortalité chez les femelles, bien que significativement augmentée à la plus faible dose, a été jugée dans le dossier réglementaire non liée au traitement en raison de l'absence de relation dose-réponse.

Tableau 20: Mortalité et taux de survie après 104 semaines (étude chez le rat, réalisée avec le fluopyram ; partie cancérogénicité)

Sex	Males				Femelles			
Dose (ppm)	0	30	150	750/375	0	30	150	1500
Mortalité totale (% mortalité)	37 (61,7)	44 (73,3)	34 (56,7)	49 (81,7)	19 (31,7)	32 (53,3)	25 (41,7)	30 (50,0)
Taux de survie ajustée (%) ^a	37,8	26,7	22,3	19,9*	68,3	46,7*	60,4	51,0

^a : test de Kaplan-Meier ; * : p ≤ 0,05

L'étude de cancérogénicité chez la souris a également été examinée par le GT pour évaluer si elle pouvait être utilisée pour dériver la DJA. Les doses d'exposition étant plus élevées que celles utilisées dans l'étude chez le rat, le GT ne recommande pas de se baser sur ces observations car cela conduirait à une DJA moins protectrice.

Par conséquent, le GT maintient l'étude de cancérogénicité chez le rat comme point de départ pour la DJA, comme retenu dans le dossier réglementaire. Cependant, le GT propose d'appliquer à la NOAEL de 1,2 mg/kg pc/j, un facteur d'incertitude de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour prendre en compte la mauvaise qualité de l'étude due à la mortalité élevée chez le rat). Ceci conduit à une DJA, finalement retenue par le GT, de 0,004 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global **faible** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il existe des études long terme chez les rats et souris. L'utilisation de doses très différentes rend difficile la comparaison de ces études et l'interprétation des résultats.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont des changements biochimiques et/ou histopathologiques au niveau du foie, de la thyroïde et des reins. Des effets similaires sont observés dans l'étude de cancérogénicité chez la souris mais à des doses d'exposition plus élevées. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas précisé.
- **le choix de l'étude clé** : bien qu'étant d'une durée adaptée pour élaborer une DJA, cette étude montre une mortalité inexpliquée en cours d'étude (270 animaux sur 560, soit 48%).
- **le choix du point de départ** : la dérivation de la DJA repose sur un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 21 : Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effet sur le foie et la thyroïde (incluant des hypertrophies) et sur les reins (effets dégénératifs). (étude 2 ans chez le rat)	1,2	100	0,012	Idem dossier réglementaire	1,2	300	0,004 Faible

Des positions divergentes concernant la qualité des études chroniques et la DJA retenue par le GT pour le fluopyram sont présentées en annexe.

6.6.2.3 ARfD

6.6.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de neurotoxicité aiguë (OCDE 424), conduite chez le rat femelle par voie orale.

Dans cette étude, des femelles ont reçu des doses uniques de 0, 25, 50 et 100 mg/kg pc de fluopyram par gavage. Elle fait suite à une première étude de neurotoxicité aiguë dans laquelle des groupes de 12 rats des deux sexes ont reçu par gavage une dose unique de 0, 125, 500 ou 2000 mg/kg pc de fluopyram. Dans cette étude initiale, une diminution dose-dépendante de l'activité motrice et de la température centrale est observée à toutes les doses chez les femelles et à partir de 250 mg/kg pc chez les mâles à J0 (aucun effet n'est rapporté aux 7 et 14^{ème} jour d'observation).

L'effet critique de l'étude clé est une diminution de l'activité motrice et locomotrice. La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 100 mg/kg pc et 50 mg/kg pc chez les rats femelles.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 50 mg/kg pc. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,5 mg/kg pc.

6.6.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur le protocole d'étude le plus pertinent pour la dérivation d'une ARfD.

Le GT note que les données présentées dans le dossier réglementaire et dans le rapport d'étude ne permettent pas une évaluation correcte de la neurotoxicité. Une expérience initiale est réalisée (aux doses de 125 à 2000 mg/kg pc) et suivie d'une étude complémentaire (aux doses de 25 à 100 mg/kg pc) en raison d'effets marqués dès la plus faible dose testée de 125 mg/kg pc. Dans l'étude initiale, les tests ont été effectués 1 heure, 7 jours et 14 jours après l'exposition. Par contre, l'étude complémentaire est menée uniquement chez les femelles et les tests sont réalisés seulement à 1 heure post-exposition, ne permettant pas l'identification d'effets pouvant se manifester ultérieurement (pas de mesure après 7 et 14 jours).

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : il existe plusieurs études de toxicité aiguë ou court terme. Cependant, les données relatives aux études de neurotoxicité aiguë sont résumées succinctement dans le volume 3B6 et les détails pas toujours retrouvés dans le rapport d'étude.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont la diminution de l'activité motrice et locomotrice dont le mode d'action n'est pas connu. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé présente plusieurs limites telles que l'absence d'exploration à distance de l'exposition (uniquement 1 h après administration), de statistiques et de données d'histopathologie. L'étude a été réalisée uniquement chez les femelles.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 22: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluopyram

Dossier réglementaire				Conclusion du GT sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Diminution de l'activité locomotrice et motrice (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)	5	100	0,5	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

6.6.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Cancérogénicité

D'après l'étude de cancérogénicité chez le rat disponible dans le dossier réglementaire, le fluopyram induit une augmentation statistiquement significative de l'incidence des adénomes hépatiques et de l'incidence cumulée des adénomes et des carcinomes hépatiques chez la femelle à la plus forte dose testée de 1500 ppm soit 89 mg/kg pc/j (11/59 versus 2/60 chez les contrôles). Dans l'étude de cancérogénicité chez la souris, une augmentation statistiquement significative des adénomes thyroïdiens des cellules folliculaires est rapportée chez les mâles (7/50 versus 1/50 dans le groupe contrôle) à la plus forte dose testée de 750 ppm (105 mg/kg pc/j). Des tumeurs sont donc observées dans deux espèces différentes et deux sexes.

Du fait de la mauvaise qualité de l'étude chez le rat, le GT recommande la réalisation d'une nouvelle étude de cancérogénicité en vue du renouvellement de l'approbation du fluopyram.

Cette substance n'a actuellement pas de classification harmonisée pour cette propriété et mériterait d'être attentivement réexaminée quant à son potentiel cancérogène.

6.7 Flutolanil

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent des volumes 1 et 3B6 (2018¹⁹ [documents soumis pour consultation publique]) et des conclusions de l'EFSA (2008). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.7.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, le flutolanil est marqué au ¹⁴C sur le noyau aniline ou pyrazole. Les études sont réalisées chez le rat exposé par gavage *via* une exposition à dose unique de 20, 100 ou 1000 mg/kg pc ou une exposition répétée de 20 mg/kg pc/j pendant 14 jours, en suspension dans de l'huile d'olive, contenant 1% de Tween 80 ou de la carboxyméthyl cellulose à 0,5%.

Le flutolanil est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal et l'absorption par voie orale est comprise entre 50 à 70 % en fonction de la dose administrée. La concentration plasmatique

¹⁹ A ce jour, les conclusions de l'EFSA basées sur le dossier de 2018 ne sont pas disponibles

maximale (T_{max}) est atteinte 2 heures après administration de doses uniques de 20 et 100 mg/kg pc, et diminue de 50 % au bout de 6 à 8 heures. Le C_{max} plasmatique est respectivement de 4,18 et 12,48 µg eq./ml pour ces deux doses.

Au niveau tissulaire, la concentration maximale est également observée 2 heures après administration, avec une distribution préférentielle dans le foie et le rein. Dans le tissu adipeux, le flutolanil ne dépasse pas 1 % de la dose.

Les métabolites retrouvés correspondent à des processus d'hydroxylation du noyau aniline, de glucurono- et sulfo- conjugaison et de clivage minoritaire de la fonction amide. Il n'existe pas de différence significative en fonction du sexe à l'exception d'une étude montrant une glucurono/sulfo conjugaison plus élevée chez la femelle. Par ailleurs, le métabolisme du flutolanil a fait l'objet d'études *in vitro* en incubant la molécule à des concentrations de 1 et 50 µM dans des suspensions de microsomes de foie de rat, lapin, chien et humain en présence ou absence de NADPH²⁰. Globalement, les métabolites identifiés *in vitro* sont les mêmes, qualitativement et quantitativement, quelque que soit l'espèce et les concentrations étudiées. De plus, ils sont identiques à ceux observés dans les études *in vivo* chez le rat.

Le flutolanil est principalement éliminé par les urines. Pour des doses de 20 et 100 mg/kg pc, on retrouve respectivement 69,1 et 66,5 % de la radioactivité dans les urines et 26,4% et 29,6% dans les urines à 72 heures post exposition. L'excrétion par l'air expiré est négligeable.

6.7.2 Revue des valeurs de référence

6.7.2.1 AOEL

6.7.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de toxicité subchronique de 90 jours (OCDE 408) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 500, 4000 et 20000 ppm de flutolanil, correspondant, respectivement, à 0, 37, 299 et 1512 mg/kg pc/j pour les mâles et 0, 44, 339 and 1743 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique correspond à l'augmentation significative du poids relatif des glandes thyroïdiennes et parathyroïdiennes (rats mâles). La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont respectivement de 4000 ppm et 500 ppm chez les rats mâles.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les mâles de 37 mg/kg pc/j (500 ppm). Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction de l'absorption par voie orale de 70%, l'AOEL établie est de 0,26 mg/kg pc/j.

6.7.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité subchronique.

Le GT note cependant une élévation significative du poids relatif (+107%) et absolu (+110%) du foie des rats femelles ainsi qu'une augmentation significative de l'albuminémie (3.8 ± 0.1 g/dl vs 3.6 ± 0.1 g/dl dans le groupe témoin) à la LOAEL de 4000 ppm. Cet effet n'est pas considéré comme un effet néfaste par l'Etat-membre rapporteur.

²⁰ nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études conduites par voie orale à 28 et 90 jours chez plusieurs espèces (rat, souris, chien) pour les deux sexes sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est une augmentation du poids relatif des glandes thyroïdes et parathyroïdes. Le mode d'action n'est pas précisé. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé retenue est réalisée chez le rat, par voie orale, pour une durée de 90 jours, durée adaptée pour la dérivation d'une AOEL. Cette étude est réalisée chez 10 animaux par sexe et par dose. Outre le témoin, 3 doses assez éloignées ont été testées (intervalle supérieure ou égale à 5).
- **le choix du point de départ** : un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 23: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Augmentation du poids relatif des glandes thyroïdiennes et parathyroïdiennes (mâles). (étude 90 jours chez le rat)	37	100 (70%)	0,26	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen fort			

6.7.2.2 DJA

6.7.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est l'étude de cancérogenèse à 2 ans (OCDE 453) réalisée chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 50 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 40, 200, 2000 et 10000 ppm de flutolanil, correspondant à 0 ; 1,8 ; 8,7 ; 86,9 et 460,5 mg/kg kg pc/j pour les mâles et 0 ; 2,1 ; 10,0 ; 103,1 and 535,8 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont des altérations histologiques de la rate avec une diminution significative du nombre de splénocytes chez les mâles, ainsi qu'une diminution significative de l'hémoglobinémie chez les femelles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 2000 ppm et 200 ppm chez les rats des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 8,7 mg/kg pc/j (200 ppm). Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,09 mg/kg pc/j.

6.7.2.2.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité chronique.

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études de toxicité chronique conduites chez plusieurs espèces pour les deux sexes (2 ans chez le rat, 18 mois chez la souris et 2 ans chez le chien) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est la diminution du nombre de splénocytes dans la rate (rats mâles) et une diminution de l'hémoglobininémie (rats femelles). Ces effets sont observés uniquement chez le rat. Les modes d'action ne sont pas précisés. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé réalisée chez le rat, par voie orale, sur une durée de 2 ans est jugée de bonne qualité. Cinquante animaux par sexe et par dose ont été utilisés. Certains examens ont été réalisés sur un nombre d'animaux restreint (n = 6/groupe). Outre le témoin, 4 doses adaptées ont été testées. A noter qu'il n'a pas été réalisé d'examen ophtalmologique ni de mesure du temps de coagulation.
- **le choix du point de départ** : un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 24: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Modification histologique de la rate avec diminution du nombre de splénocytes (mâles) et diminution de l'hémoglobininémie (femelles) (étude 2 ans chez le rat)	8,7	100	0,09	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			

6.7.2.3 ARfD

6.7.2.3.1 Description de l'ARfD

D'après les conclusions de l'EFSA de 2008, le profil toxicologique du flutolanil ne justifiait pas la détermination d'une ARfD. Néanmoins, dans le DAR de 2018 issu de la ré-évaluation du flutolanil, une ARfD est établie.

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité prénatale (OCDE 414) chez le lapin, réalisée par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 13 à 16 lapines gestantes ont reçu 0, 40, 200 ou 1000 mg/kg pc/j de flutolanil par gavage du 6^{ème} au 18^{ème} jour de leur gestation.

L'effet critique est un nombre augmenté de morts et de résorptions fœtales (non statistiquement significatif mais avec une tendance positive : 1% chez les témoins, 3,8% à 200 mg/kg pc/j et 6,9% à 1000 mg/kg pc/j). La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 200 mg/kg pc/j et 40 mg/kg pc/j.

Ainsi, le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 40 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), l'ARfD établie est de 0,4 mg/kg pc.

6.7.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. En effet, les effets observés dans les études de développement en l'absence de toxicité maternelle sont pertinents pour fixer une ARfD.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études de tératogénèse conduites chez plusieurs espèces (1 étude chez le rat et 2 études chez le lapin) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est l'augmentation non statistiquement significative du nombre de morts et de résorptions fœtales dans une étude chez le lapin. Cet effet est également retrouvé dans une seconde étude chez le lapin. Cet effet n'est pas retrouvé chez le rat. Le mode d'action n'est pas précisé. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est une étude de toxicité prénatale réalisée chez le lapin, par voie orale. Treize à seize femelles par dose ont été utilisées. Outre le groupe témoin, 3 doses adaptées ont été testées. La durée de l'étude (administration du 6^{ème} au 18^{ème} jour de la gestation) ne respecte pas la ligne directrice actuelle de l'OCDE (exposition requise jusqu'au 27^{ème} jour de gestation) mais est adaptée pour la dérivation d'une ARfD.
- **le choix du point de départ** : un couple NOAEL/LOAEL est disponible.

Tableau 25: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le flutolanil

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Résorption et mortalité fœtale (étude de toxicité)	40	100	0,4	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

prénatale chez le lapin)				
--------------------------	--	--	--	--

6.7.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Immunotoxicité

S'agissant de l'immunotoxicité, un test TDAR²¹ a été réalisé chez le rat suite à une administration pendant 4 semaines du flutolanil aux doses de 0, 750, 3000 et 12000 ppm dans l'alimentation. Un examen anatomopathologique de la rate a constaté une diminution du nombre de cellules spléniques totales et viables à partir de 3000 ppm. Une NOAEL pour cet effet a été proposée à la dose de 750 ppm correspondant à 61,1 mg/kg pc/j chez les mâles et à 74,6 mg/kg pc/j chez les femelles.

Toxicité des métabolites

Des études de toxicité ont été réalisées sur les métabolites M-101 (2(trifluorométhyl)-benzamide) et M-102 (2-(trifluorométhyl)-benzoic acid), issus du clivage de la fonction amide. Ces métabolites sont retrouvés dans l'urine des rats, à hauteur de 0,05 – 0,08% de la radioactivité après administration d'une dose orale de 20 mg/kg de flutolanil. Ces métabolites sont également observés avec le fluopyram, à des niveaux plus élevés qu'avec le flutolanil. L'Etat-membre rapporteur considère que les données avec le flutolanil ne peuvent pas couvrir la toxicité de ces métabolites.

Pour le M-101, l'étude à 28 jours chez le rat met en évidence des effets similaires à ceux retrouvés pour le composé parent. En particulier, sont observés des effets sur le foie (élévation des poids absolu et relatif, hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires), une anémie chez les femelles, ainsi une augmentation du poids de la thyroïde, associée à une hypertrophie des cellules folliculaires dans une minorité de mâles testés. Ces effets apparaissent à la dose de 200 ppm (soit 17-18 mg/kg pc/j). Des effets rénaux (décrits comme des néphropathies avec α -2 microglobuline) sont aussi observés chez les mâles mais considérés non pertinents pour l'humain.

Pour le M-102, l'étude à 28 jours chez le rat révèle un profil similaire. Des effets sur le foie et une anémie chez les femelles sont retrouvés à la dose de 15000 ppm (1316-1359 mg/kg pc/j). La NOAEL est fixée à la dose de 3000 ppm (soit 252-296 mg/kg pc/j). Il apparaît aux experts du GT que ce choix de la dose de 252 mg/kg pc/j comme NOAEL est questionnable. A cette dose sont retrouvées chez les mâles une augmentation statistiquement significative du poids de la rate (non observées à la plus forte dose testée) et du poids relatif du foie.

6.8 Fluxapyroxad

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2011), des conclusions de l'EFSA (2012) et de l'opinion du RAC (2018). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

²¹ T cell dependant antibody response assay

6.8.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, un marquage au ^{14}C en position 4 du noyau pyrazole et une forme marquée ^{15}N sont utilisés. L'étude de la toxicocinétique est réalisée par gavage chez le rat en utilisant un mélange aqueux contenant 0,5% carboxyméthyl cellulose (CMC) et 1% cremophor. Les doses utilisées vont de 7,5 à 500 mg/kg pc.

Le fluxapyroxad est rapidement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal. L'absorption orale atteint 65% chez le mâle et 67% chez la femelle pour la dose testée de 150 mg/kg pc/j. Elle est de 68% chez le mâle et 80% chez la femelle à la dose de 7,5 mg/kg pc/j. Le Tmax varie de 1 à 24 heures et le Cmax de 1,5 à 66 $\mu\text{g eq/g}$ pour les concentrations de 5, 50 et 500 mg/kg pc.

Le fluxapyroxad est largement distribué dans tous les tissus. Les concentrations maximales sont généralement atteintes aux premiers temps échantillonnés (1 heure et 16 heures respectivement pour les deux doses testées de 7,5 et 150 mg/kg pc), à l'exception des intestins et du tissu adipeux à la dose de 7,5 mg/kg pc, pour lesquels le maximum est atteint après 8 heures chez les mâles et 20 à 28 heures chez les femelles. Les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans le tractus gastro-intestinal, le foie et les surrénales, pour les deux sexes et aux deux doses testées. De fortes concentrations sont également retrouvées dans le tissu adipeux après 16 heures dans les deux sexes à la dose forte.

Le fluxapyroxad est métabolisé rapidement en une cinquantaine de métabolites. Chez le rat, le composé parent est principalement métabolisé par hydroxylation du groupement diphényle, N-déméthylation du noyau pyrazole, perte d'un fluor au niveau du noyau diphényle, sulfatation ou glucuronidation au niveau des groupes hydroxyles ou conjugaison avec des dérivés de glutathion. Un métabolite formé par les végétaux a été considéré dans ces études, sa toxicocinétique est similaire à celle du composé parent. Aucune différence métabolique en fonction du sexe n'est observée.

Les demi-vies terminales pour les trois doses sont similaires entre les mâles (34,3, 37,2 et 53,2 heures) et les femelles (30,1, 36,0 et 38,5 heures) sauf à forte dose à laquelle la demi-vie est plus longue chez les mâles. La principale voie d'élimination est les fèces (~90%) *via* la bile (50 - 60%), suivi des urines (entre 3 - 9%), 7 jours post exposition. Le composé parent est retrouvé uniquement dans les fèces à hauteur de 30%.

6.8.2 Revue des valeurs de référence

6.8.2.1 AOEL

6.8.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de 90 jours (OCDE 408), conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 500, 2000 ou 6000 ppm de fluxapyroxad, ce qui correspond à 0 ; 6,1 ; 31 ; 126 ou 407 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 7,3 ; 35 ; 144 ou 424 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique est une atteinte du foie chez les animaux des deux sexes : augmentation statistiquement significative des poids relatif et absolu et hypertrophie centrolobulaire (chez 9/10 animaux de chaque sexe *versus* 0/10 chez les contrôles). La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 500 ppm et 100 ppm chez les rats.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les mâles de 6,1 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction pour l'absorption orale de 68%, l'AOEL établie est de 0,04 mg/kg pc/j.

6.8.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité subchronique.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : plusieurs études de toxicité répétée sont disponibles et respectent les lignes directrices de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique est une hypertrophie hépatique sans information sur le mode d'action du fluxapyroxad. Le foie est une cible de la toxicité du fluxapyroxad dans toutes les études et les lésions progressent en fonction de la dose. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de 90 jours est adaptée à la dérivation d'une AOEL.
- **le choix du point de départ** : la dérivation de l'AOEL repose sur un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 26: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets hépatiques (augmentation du poids, hypertrophie) (étude 90 jours chez le rat)	6	100 (68%)	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.8.2.2 DJA

6.8.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de 2 ans (OCDE 453) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 50, 250, 1500 ou 3000 ppm de fluxapyroxad, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 2,1 ; 11 ; 68 ou 145 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 2,7 ; 14 ; 82 ou 182 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique est une atteinte hépatique (augmentation du poids du foie, hypertrophie hépatocellulaire chez les deux sexes et adénomes hépatocellulaires chez les mâles). La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 250 ppm et 50 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 2 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,02 mg/kg pc/j.

6.8.2.2.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise. Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études de toxicité chronique.

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : plusieurs études de toxicité chronique sont disponibles et respectent les bonnes pratiques de laboratoires et les requis réglementaires de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique est l'hypertrophie hépatique sans information sur le mode d'action du fluxapyroxad. Le foie est une cible de la toxicité du fluxapyroxad dans toutes les études et les lésions progressent en fonction de la dose. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est jugée de bonne qualité et présente une durée adaptée pour dériver une DJA.
- **le choix du point de départ** : La dérivation de la DJA repose sur un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 27: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le foie (incluant une hypertrophie et des adénomes hépatocellulaires) (étude 2 ans chez le rat)	2,1	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			

6.8.2.3 ARfD

6.8.2.3.1 Description de l'ARfD

Les études clé utilisées pour l'élaboration de l'ARfD sont les études de toxicité prénatale (OCDE 414) conduites chez le lapin et le rat par voie orale.

Dans l'étude chez le lapin, des groupes de 25 femelles gestantes ont reçu 0, 10, 25 ou 60 mg/kg pc/j de fluxapyroxad par gavage du 6^{ème} au 28^{ème} jour de leur gestation. Les effets critiques sont des effets développementaux chez le lapin (incluant des pertes post-implantatoires) et une diminution du poids corporelle de la mère. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 60 mg/kg pc/j et 25 mg/kg pc/j.

Dans l'étude chez le rat, des groupes de 25 femelles gestantes ont reçu 0, 25, 200 ou 1000 mg/kg pc/j de fluxapyroxad par gavage du 6^{ème} au 19^{ème} jour de leur gestation. L'effet critique est une diminution du gain de poids maternel chez le rat. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 200 mg/kg pc/j et 25 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 25 mg/kg pc/j. Après l'application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,25 mg/kg pc.

6.8.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Elle se base sur la NOAEL la plus faible parmi les études pertinentes pour dériver une ARfD. En effet, une NOAEL plus élevée (125 mg/kg pc/j) est rapportée dans l'étude de neurotoxicité aiguë chez le rat.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : plusieurs études de toxicité aiguë ou court terme sont disponibles et respectent les bonnes pratiques de laboratoires et les requis réglementaires de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont un retard de gain de poids corporel maternel et une augmentation de l'incidence des pertes post-implantatoires. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas décrit.
- **le choix de l'étude clé** : les études clé sont jugées de bonne qualité. La fenêtre d'exposition des mères est adaptée à la dérivation de l'ARfD.
- **le choix du point de départ** : la dérivation de l'ARfD repose sur un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 28: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le fluxapyroxad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc/j)

							Niveau de confiance
Effets développementaux chez le lapin (pertes post-implantatoires), diminution du poids des mères et diminution du gain de poids maternel chez le rat (étude de toxicité prénatale chez le rat et le lapin)	25	100	0,25	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

6.9 Isofetamid

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2014) et des conclusions de l'EFSA (2015). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.9.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, l'isofetamid est marqué au ^{14}C sur le noyau phényle ou sur le groupement thiophène. L'étude est réalisée chez le rat par une exposition unique à 5 mg/kg pc ou 200 mg/kg pc par gavage ou encore par exposition répétée à 5 mg/kg pc/j pendant 14 jours (les deux utilisant une suspension 3% en masse dans de l'hydroxypropyle cellulose avec ajout de Tween).

Une absorption moyenne de 89% est estimée. Le Tmax plasmatique varie entre 1,8 et 8,5 heures pour les femelles et 5,5 et 7,8 heures pour les mâles en fonction de la dose d'administration et du type de radiomarquage. Le Cmax plasmatique varie entre 1235 et 13054 ng eq/g pour la femelle et entre 1263 et 28332 ng eq/g pour les mâles. Des valeurs similaires sont retrouvées pour le marquage thiophène.

L'isofetamid est très largement distribué dans le corps. Les plus fortes concentrations de radioactivité ont été retrouvées dans le tractus gastro-intestinal et le foie.

L'isofetamid est largement métabolisé (> 80%) après administration orale, avec 7 métabolites principaux retrouvés dans les urines et les fèces. Les mécanismes impliquent des O-désalkylation, glucuronidation, oxydation, hydroxylation, sulfatation.

Plus de 80% de la radioactivité est excrétée en 48 heures chez les femelles et les mâles. La radioactivité est mesurée dans les urines (6-15%), dans la bile (83-88%) et dans la carcasse (0,5-2,1%). La position du marquage n'affecte pas les voies d'excrétion. Une différence d'absorption/excrétion est cependant notée entre les femelles et les mâles, avec une excrétion urinaire 5 fois plus élevée chez les femelles. Il n'y a pas d'exhalation significative de $^{14}\text{C-CO}_2$ et par conséquent de métabolisme pulmonaire significatif.

6.9.2 Revue des valeurs de référence

6.9.2.1 AOEL

6.9.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude d'1 an (OCDE 452) conduite chez le chien par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 4 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 60, 200 ou 6000 ppm d'isofetamid, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 1,61 ; 5,35 ou 166 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,57 ; 5,58 ou 178 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques de cette étude sont une diminution du poids corporel et une diminution de la prise de poids. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets sont de 200 ppm et 60 ppm chez les chiens des deux sexes.

Cependant, les effets critiques (statistiquement significatifs) retenus pour l'établissement de l'AOEL à partir de cette même étude sont une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et du poids du foie ainsi qu'une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires dans les deux sexes, associées à une augmentation de l'activité de la gamma-glutamyltranspeptidase et de la cholestérolémie, chez les mâles. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 6000 ppm et 200 ppm chez les chiens des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les mâles de 5,35 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,05 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

L'étude de 90 jours chez le chien est utilisée pour justifier l'utilisation de la NOAEL sur les effets hépatiques d'après l'étude d'1 an chez le chien pour établir l'AOEL. En effet, dans l'étude de 90 jours, des effets sur le foie sont rapportés à la dose de 1000 ppm conduisant à une NOAEL de 100 ppm, inférieure à la NOAEL pour ces mêmes effets sur le foie (200 ppm) dans une étude de plus long terme, en raison des intervalles de doses choisis (voir tableau ci-dessous). Ainsi, l'EFSA a jugé pertinent de prendre en compte la NOAEL pour les effets hépatiques issue de l'étude d'1 an chez le chien comme point de départ de l'AOEL.

Tableau 29 : NOAEL et LOAEL pour les effets hépatiques dans les études de 90 jours et d'1 an chez le chien

ppm	100	200	1000	6000	10000
mg/kg pc/j	2,95	5,34	29,3	166	301
Etude 90 jours, chien	NOAEL		LOAEL ↑ PAL, ↑ poids du foie, ↑ hypertrophie		
Etude 1 an, chien		NOAEL		LOAEL ↑ PAL, ↑ poids du foie	
LOAEL/NOAEL globales à 90 jours pour les effets hépatiques		NOAEL	LOAEL		

6.9.2.1.2 *Analyse critique du GT*

Une étude de 90 jours réalisée chez le chien (OCDE 409) est disponible dans le dossier réglementaire.

Dans cette étude, des groupes de 4 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 1000 ou 10000 ppm d'isofetamid, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 2,95 ; 29,3 ou 301 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 3,07 ; 32,7 ou 314 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont une augmentation des phosphatases alcalines (statistiquement significative chez les femelles), une augmentation du poids absolu et relatif du foie (statistiquement significative chez les femelles) et une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires (2/4 femelles *versus* 0/4 dans les contrôles).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 ppm et 100 ppm. Il existe donc une NOAEL plus faible que celle servant de base à la VTR actuelle, pour des mêmes effets et issue d'une étude de 90 jours (durée adaptée pour dériver une AOEL).

Le GT propose de retenir comme étude clé, l'étude à 90 jours chez le chien, en prenant en compte les effets sur le foie conduisant à une NOAEL de 2,95 mg/kg pc/j chez les mâles. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL proposée est de 0,03 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : de nombreuses études sur au moins 3 espèces sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'hépatotoxicité est retrouvée dans plusieurs études mais le mode d'action est inconnu sur ce paramètre. Cet effet est considéré par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé suit les requis réglementaires, mais présente à trop grand espacement de doses (x10). Cette étude est d'une durée adaptée pour la dérivation d'une AOEL.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 30: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Baisse du poids corporel. Effets hépatiques (incluant une augmentation du poids du foie, une augmentation des PAL et une hypertrophie)	5,34	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,05	Mêmes effets hépatiques retenus (étude 90 jours chez le chien)	2,95	Idem dossier réglementaire	0,03 Moyen

(étude 1 an chez le chien)							
----------------------------	--	--	--	--	--	--	--

6.9.2.2 DJA

6.9.2.2.1 *Description de la DJA*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude d'1 an (OCDE 452) conduite chez le chien par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 4 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 60, 200 ou 6000 ppm d'isofetamid, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 1,61 ; 5,35 ou 166 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,57 ; 5,58 ou 178 mg/kg pc/j pour les femelles.

L'effet critique est une diminution statistiquement significative du poids corporel et de la prise de poids. La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 200 ppm et 60 ppm chez les chiens des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les femelles de 1,57 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,02 mg/kg pc/j.

6.9.2.2.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études sur plusieurs espèces (chiens et rongeurs) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : une diminution du poids corporel et de la prise de poids est notée dans plusieurs études à des doses parfois très différentes et essentiellement chez le chien. Le mécanisme d'action est inconnu. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : Il s'agit d'une étude de bonne qualité, dans un contexte réglementaire. L'utilisation d'une étude de 1 an chez le chien pour dériver une DJA, *versus* 2 ans chez le rongeur par exemple, peut être discutée. Cependant, cette étude conduit à retenir une NOAEL plus faible.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 31: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Diminution du poids et du gain	1,57	100	0,02	Maintien de la VTR actuelle			

de poids corporel (étude 1 an chez le chien)				Niveau de confiance : Moyen
--	--	--	--	-----------------------------

6.9.2.3 ARfD

6.9.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité pour le développement prénatal (OCDE 414) réalisée chez le lapin.

Dans cette étude, des groupes de 25 femelles ont reçu des doses de 0, 100, 300 ou 1000 mg/kg pc/j d'isofetamid par gavage entre le 6^{ème} et le 27^{ème} jour de gestation.

Les effets critiques sont une diminution statistiquement significative de la consommation alimentaire ainsi qu'une augmentation dose dépendante des variations squelettiques (vertèbres présacrées) chez les fœtus (18/196 fœtus *versus* 7/198 fœtus).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 300 mg/kg pc/j et 100 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 100 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), l'ARfD établie est de 1 mg/kg pc.

6.9.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études sur plusieurs espèces (chiens et rongeurs) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques retenus sont une diminution de la consommation alimentaire chez la mère et des anomalies squelettiques chez le fœtus. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mécanisme d'action est inconnu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de toxicité du développement prénatal chez le lapin est de bonne qualité et adaptée pour dériver une ARfD.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 32: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isofetamid

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance

Diminution de la consommation alimentaire chez les mères. Augmentation des variations squelettiques chez les fœtus. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	100	100	1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort
---	-----	-----	---	---

6.9.3 Points d'attention spécifique à la substance

Les effets suivants reportés comme non-reliés au traitement dans le dossier réglementaire pourraient être en lien avec une inhibition de la SDH :

- 1) Dans l'étude d'1 an chez le chien, 1/4 femelle traitées à la plus forte dose de 166 mg/kg pc/j a été euthanasiée compte tenu de son état moribond en semaine 34. Cet animal présentait une position latérale, une activité spontanée très réduite avant la mort, une bradypnée (ralentissement de la respiration), une augmentation du nombre de cellules nucléées de la moelle osseuse, une augmentation des phosphatases alcalines et du poids du foie, un œdème pulmonaire, une dégénérescence du muscle cardiaque et une hypertrophie hépatocellulaire (le GT déplore que le tractus gastro-intestinal n'ait pas été investigué (cf point #2). Le pétitionnaire considère que, bien que les effets hépatiques puissent être reliés au traitement, ces derniers n'ont pas pu provoquer l'état moribond de l'animal. Il conclut que la mort était spontanée et vraisemblablement liée à un trouble circulatoire spontané²². L'État-membre rapporteur note dans le DAR qu'aucune justification n'est fournie pour étayer cette déclaration et qu'il ne faut pas exclure que la mort puisse être reliée au traitement. Cette position est aussi supportée par le GT. En effet, parmi différentes causes possibles pouvant expliquer la mort de l'animal, l'ensemble des observations pourrait aussi évoquer une inactivation du complexe II, qui peut se caractériser par une défaillance multi-viscérale avec entre autres : détresse respiratoire, syndrome de Leigh, hépato-splénomégalie, cardiomégalie, spasticité (contraction muscle, perte de mobilité...).
- 2) Des signes cliniques gastro-intestinaux sont rapportés chez les chiens mâles et femelles dans les études sur 90 jours et 1 an : vomissements, incluant du liquide mousseux, selles molles avec une incidence plus élevée chez les femelles traitées dès les faibles doses. Du fait de l'absence de relation dose-réponse, ces manifestations sont considérées comme sporadiques par le déclarant. Le GT note que ces signes cliniques évoquent une atteinte gastro-intestinale à rapprocher de la distribution tissulaire de l'isofetamid.

6.10 Isopyrazam

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2010), des conclusions de l'EFSA (2012) et de l'opinion du RAC (2020). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

²² *spontaneous circulatory disorder*

L'isopyrazam existe sous la forme d'isomères syn (CAS 683777-13-1) et anti (CAS 683777-14-2). Le pétitionnaire déclare que les deux isomères sont biologiquement actifs.

La spécification de l'isopyrazam couvre une gamme en isomères de 70% syn:30% anti à 100% syn. Cependant, la plupart des études de toxicocinétique et de toxicité chez les mammifères est réalisée avec le racémique contenant 93% (p/p) de l'isomère syn et 7% (p/p) de l'isomère anti. Des études sont également conduites avec le racémique 70% syn:30% anti afin de comparer leur profil toxicocinétique et de justifier l'utilisation du racémique 93% syn:7% anti pour prédire la toxicité de l'isopyrazam contenant jusqu'à 30% d'isomère anti.

6.10.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, l'isopyrazam est marqué au ^{14}C sur le noyau [Pyrazole -5-syn- ^{14}C]-Isopyrazam. Les études de la toxicocinétique sont réalisées chez le rat par une exposition unique à des concentrations de 2,5 et 250 mg/kg pc ou 1 et 75 mg/kg pc par gavage, en fonction des études, dans une suspension à 0,5% de carboxyméthylcellulose (CMC). Une étude par exposition répétée à la dose de 1 mg/kg pc/j est également disponible chez le rat mâle.

L'absorption est estimée entre 63 et 73 % de la dose administrée, 48 heures après gavage d'une dose de 1 et 75 mg/kg pc, respectivement. Le T_{max} est de 6 heures pour les mâles et de 3 heures pour les femelles à la dose de 1 mg/kg pc et entre 3 et 4 heures pour les deux sexes à la dose de 75 mg/kg pc. Le C_{max} varie entre 0,16 à 17,7 $\mu\text{g eq/g}$ pour les femelles et 0,0857 à 7,56 $\mu\text{g eq/g}$ pour les mâles à des doses de 1 et 75 mg/g pc respectivement.

Une autoradiographie du corps entier, après administration d'une dose unique de 2,5 ou 250 mg/kg pc, montre que la distribution de la radioactivité est observée dans tous les organes, 2 heures après l'exposition, avec un pourcentage plus important dans l'estomac, le tractus gastro-intestinal, le foie et les reins et des niveaux plus faibles dans le tissu adipeux abdominal, le tissu adipeux brun et la glande de Harder. Très peu de radioactivité est retrouvée dans le corps des rats 48 heures après l'exposition. La majorité de la radioactivité restante se trouve dans le tractus gastro-intestinal et l'estomac, avec un faible pourcentage dans le foie et les reins. Dans les autres études de distribution, les concentrations les plus élevées sont observées dans le foie, les reins et les glandes surrénales chez les mâles et les femelles aux deux doses testées, avec un pic de concentration entre 6 et 10 heures après l'administration. Les concentrations dans tous les tissus diminuent ensuite avec des demi-vies entre 3 et 90 heures. Il n'y a pas d'accumulation de radioactivité dans les tissus.

Le métabolisme de l'isopyrazam ne comporte pas de clivage, ce qui indique que les niveaux de radioactivité détectés dans les différents organes incluent la molécule parent et les métabolites. Le métabolisme de l'isopyrazam donne lieu à plus de 25 métabolites avec un potentiel d'isomères multiples dans la plupart des groupes. Le mécanisme proposé inclut une étape d'hydroxylation dans la région bicyclo-isopropyle, suivie d'une oxydation pour former l'acide carboxylique et/ou générer de multiples fragments hydroxyle avec formation ultérieure d'acide glucuronique ou de conjugués sulfate. Ce processus oxydatif se produit également après la N-déméthylation de l'isopyrazam, donnant lieu à un ensemble de métabolites N-oxo-déméthylés et à leurs conjugués.

Les métabolites non conjugués sont éliminés dans l'urine et les métabolites conjugués dans la bile. Quarante-huit heures après administration d'une dose unique d'isopyrazam, 48 à 58 % de la dose administrée est retrouvée dans la bile, 21 à 36 % dans les fèces et 7 à 16 % dans les urines. La demi-vie d'élimination dans le sang après l'administration d'une dose unique varie entre 4,5 et 7,5 heures. Après une administration répétée de 14 doses, elle est estimée à 251 heures, sans qu'aucune explication de la différence entre ces valeurs ne soit fournie.

6.10.2 Revue des valeurs de référence

6.10.2.1 AOEL

6.10.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude réalisée sur 2 générations (OCDE 416) chez le rat par voie orale.

Pour cette étude, des groupes de 26 animaux de chaque sexe ont consommé, à partir de la 5^{ème} semaine de vie des aliments contenant 0, 100, 500 ou 3000 ppm d'isopyrazam de ratio syn:anti 93%:7% et accouplés après 10 semaines de traitement. De même, des groupes de 26 animaux de chaque sexe de la génération F1 ont été sélectionnés pour recevoir les mêmes traitements et être accouplés après 10 semaines. L'étude s'est terminée à la 4^{ème} semaine de vie de la génération F2. Les équivalences des doses d'exposition en mg/kg pc/j sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 33 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j

	Mâles			Femelles		
	100 ppm	500 ppm	3000 ppm	100 ppm	500 ppm	3000 ppm
Période pré-accouplement						
Génération F0	8	41	250	9	41	277
Génération F1	9	48	288	10	50	301
Période de gestation						
Génération F0	-	-	-	7	37	217
Génération F1	-	-	-	8	41	239
Période de lactation						
Génération F0	-	-	-	25	119	700
Génération F1	-	-	-	24	129	774

Les effets critiques sont, chez les parents des générations F0 et F1 :

- une diminution du gain de poids corporel et de la consommation alimentaire (effets statistiquement significatifs chez la femelle à certains points de mesure),
- une augmentation statistiquement significative du poids relatif du foie et une hypertrophie hépatocytaire centrolobulaire (incidence et significativité statistique non reportées dans le dossier réglementaire).

Chez les nouveau-nés des générations F1 et F2, l'effet critique est une augmentation statistiquement significative du poids relatif du foie au moment du sevrage.

La LOAEL et la NOAEL pour tous ces effets critiques sont de 500 ppm et 100 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 8 mg/kg pc/j pour la toxicité parentale et les effets dans la descendance. Après application d'un facteur d'incertitude de

100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle) et d'un facteur de correction de l'absorption par voie orale de 64%, l'AOEL établie est de 0,05 mg/kg pc/j.

6.10.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : plusieurs études de toxicologie sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : la réduction du gain de poids corporel et de la consommation alimentaire, l'augmentation du poids du foie et l'hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires, ainsi que l'augmentation du poids du foie dans les descendances F1 et F2 en réponse à une exposition à l'isopyrazam ne présentent pas de mode d'action connu. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est une étude de reprotoxicité et toxicité développementale sur 2 générations chez le rat. L'étude est de qualité correcte et d'une durée adaptée pour dériver une AOEL.
- **le choix du point de départ** : un couple LOAEL/NOAEL est disponible.

Tableau 34: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le poids corporel et hépatiques (augmentation du poids et hypertrophie) (étude multigénérationnelle chez le rat)	8	100 (64%)	0,05	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.10.2.2 DJA

6.10.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de cancérogénicité sur 2 ans (OCDE 453) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 52 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 500 et 3000 ppm d'isopyrazam, de ratio syn:anti 93%:7%, ce qui correspond

à des expositions à 0, 5,5, 28 ou 173 mg/kg pc/j pour les mâles et 0, 7, 35 ou 233 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont une augmentation du poids du foie (non statistiquement significatif), ainsi qu'une augmentation statistiquement significative de l'incidence de l'hypertrophie des hépatocytes (deux sexes) et d'une hyperplasie des canaux biliaires (mâles).

Cette étude ne permet pas d'identifier une NOAEL. La LOAEL pour ces effets critiques est de 100 ppm chez les rats des deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la LOAEL chez les mâles de 5,5 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 200 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle, 2 pour avoir utilisé une LOAEL au lieu d'une NOAEL comme point de départ), la DJA établie est de 0,03 mg/kg pc/j.

6.10.2.2.2 Analyse critique du GT

Le GT considère que, puisque la VTR est dérivée sur la base d'une LOAEL, le facteur d'incertitude doit être pondéré d'un facteur de 3 par défaut et non 2, en cohérence avec la méthodologie européenne et le guide méthodologique de l'Anses.

Le GT préconise donc une valeur de DJA de 0,018 mg/kg pc/j en considérant la même étude clé et les mêmes effets critiques mais en appliquant un facteur de sécurité de 300 et non de 200.

Un niveau de confiance global **moyen faible** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : le corpus de données comprend une étude chez le rat (2 ans) et une étude chez la souris (80 semaines).
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques retenus sont une augmentation du poids du foie et une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires, précédant la survenue, aux doses supérieures, d'autres altérations du parenchyme hépatique. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas explicité.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé réalisée chez le rat, avec une exposition par voie orale sur une durée de 2 ans est jugée de bonne qualité et présente une durée adaptée pour dériver une DJA.
- **le choix du point de départ** : la dose utilisée pour la dérivation de la DJA est une LOAEL (absence de NOAEL).

Tableau 35: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effet sur le foie (incluant une hypertrophie) (étude 2 ans chez le rat)	Pas de NOAEL LOAEL = 5,5	200	0,03	Idem dossier réglementaire	Idem dossier réglementaire	300 (LOAEL–NOAEL)	0,018 Moyen faible

6.10.2.3 ARfD

6.10.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité pour le développement prénatal (OCDE 414) réalisée chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 24 femelles ont reçu des doses de 0, 20, 75 ou 200 mg/kg pc/j d'isopyrazam, de ratio syn:anti 70%:30%, par gavage entre le 4^{ème} et le 20^{ème} jour de gestation.

L'effet critique est une diminution du poids maternel statistiquement significative. La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 75 mg/kg pc/j et 20 mg/kg pc/j. Une diminution statistiquement significative du poids foetal et une augmentation statistiquement significative de l'incidence des variations squelettiques (non ossification de la troisième vertèbre cervicale) sont observées chez les fœtus également à la dose de 75 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 20 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), l'ARfD établie est de 0,2 mg/kg pc.

6.10.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Si les discussions du GT n'ont pas remis en cause cette VTR, il est à noter que des effets critiques apparus dans d'autres études développementales, à des doses certes plus fortes, n'ont pas été rapportés dans l'étude retenue (malformations cardiaques, ophtalmiques). La convergence des effets oculaires retrouvés dans 5 études sur 6 soulève un point d'attention (voir ci-dessous dans la section points d'attention).

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il existe plusieurs études court terme disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est la diminution du gain de poids corporel maternel chez les rats dans les premiers jours de l'administration de la substance. Le mode d'action impliqué pour cet effet critique est inconnu. Cet effet est considéré par défaut transposable à l'humain. D'autres effets retrouvés à la même dose n'ont pas été retenus comme effets critiques (diminution du poids foetal, retard d'ossification).
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est adéquate pour dériver une ARfD. Sa qualité est correcte.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 36: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour l'isopyrazam

Dossier réglementaire	Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles
-----------------------	---

Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	AOEL (mg/kg pc) Niveau de confiance
Diminution du gain de poids maternel. (étude de toxicité prénatale chez le rat)	20	100	0,2	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

6.10.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Cancérogénicité et utilisation inappropriée des contrôles historiques

Dans l'étude de cancérogénicité chez le rat, à la plus forte dose d'exposition (3000 ppm soit environ 173-233 mg/kg pc/j), des tumeurs hépatiques (adénomes), utérines (adénocarcinomes) et thyroïdiennes (adénomes) ont été observées chez les femelles, et des tumeurs thyroïdiennes (adénomes) chez les mâles.

Les effets hépatiques et thyroïdiens sont décrits dans les sections 8.1 et 0.

Concernant les tumeurs thyroïdiennes, leur incidence est un peu au-dessus des contrôles historiques mais restent dans la gamme des contrôles de la base de données RITA (*Registry of Industrial Toxicology Animal-data*) fournis par les industriels. Le recours aux contrôles historiques dans ce type d'analyses est utilisé pour augmenter la taille du groupe contrôle, et de fait, a pour conséquence d'exclure du seuil de significativité certaines observations. Le GT n'est pas favorable à cette manière de faire et s'interroge sur sa pertinence et sur sa validité: elle constitue selon lui une manière d'augmenter artificiellement le nombre de sujets contrôles. La problématique des contrôles historiques et du recours à la base de données RITA a été très discutée car régulièrement retrouvée dans différents dossiers de substances actives SDHI. Il est à noter qu'un projet de l'EFSA est actuellement en cours pour une bonne utilisation des contrôles historiques dans les études d'(éco)toxicologie l'EFSA²³.

Concernant les adénocarcinomes utérins, le mode d'action proposé par l'État membre soumissionnaire du dossier de classification repose sur une diminution de la leptine plasmatique rendant compte de la diminution du poids corporel des animaux exposés et d'une diminution de la signalisation dopaminergique au niveau hypothalamique, induisant une diminution de la prolactinémie liée à l'âge qui se produit au niveau pituitaire. Ces signaux pourraient altérer la transition vers une sénescence reproductive au niveau de cellules ovariennes et utérines, avec pour conséquence une hyperprolifération des cellules utérines, conduisant à une augmentation de l'incidence des adénocarcinomes utérins. Un certain nombre de ces hypothèses ont été confortées par des expériences complémentaires menées *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, le RAC conclut à une probable absence de transposabilité de ce mode d'action entre les rongeurs et l'humain en raison de différences dans le cycle hormonal chez l'humain par rapport au rongeur.

Il est à noter que du fait de l'ensemble de ces effets et ces argumentaires (mentionnés ici et dans la partie 0), le RAC a classé, en 2020, la substance cancérogène de catégorie 2 selon le règlement CLP. Cette classification a été implémentée dans le règlement CLP en 2022. La

²³ <https://en.bpi.gr/newsdet.aspx?id=1035>

substance n'est actuellement plus approuvée comme substance active phytopharmaceutique (règlement d'exécution du 18/05/2022).

Toxicité reproductive et développementale

Le dossier réglementaire conclut à l'absence de toxicité sur la fertilité et les capacités de reproduction sur la base d'une absence d'effet sur les paramètres de la reproduction, sur la taille des portées ou en terme de malformation et de survie des petits dans l'étude sur deux générations. Cependant, cette étude montre une diminution statistiquement significative du poids absolu et relatif des ovaires et de l'utérus chez les femelles F0 et F1 à la plus forte dose testée de 3000 ppm. Le GT considère que ces observations évoquent des effets toxiques pour la reproduction. Le GT note aussi l'absence de recherche d'effets neurodéveloppementaux dans la descendance.

Deux études chez le rat et quatre études chez le lapin se sont intéressées aux effets de l'isopyrazam sur le développement.

Les études chez le rat mettent principalement en évidence des malformations oculaires et des retards d'ossification à partir de la concentration de 75 mg/kg pc/j. Chez le lapin, des malformations cardiaques, oculaires et des retards d'ossification sont également rapportés à des doses plus élevées. Il est à noter que la mise en place du système oculaire est complète à partir de la deuxième semaine après la naissance alors que les animaux sont sacrifiés avant dans ces études.

Ces effets néfastes sur le développement oculaire et cardiaque sont détaillés dans les sections 0 et 8.8.1. Il est à noter que la substance a été classée par le RAC en 2020 comme Repr. 1B sur la base des effets observés sur le développement du squelette et de l'œil. Cette classification a été implémentée dans le règlement CLP en 2022. La substance n'est actuellement plus approuvée comme substance active phytopharmaceutique (règlement d'exécution du 18/05/2022).

6.11 Penflufen

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2011 & 2016), des conclusions de l'EFSA (2016) et de l'opinion du RAC (2018). De plus, le rapport d'étude de la neurotoxicité aiguë a été consulté. Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.11.1 Partie toxicocinétique

Selon le dossier réglementaire, le penflufen est un mélange racémique (1 :1) de deux énantiomères (R, S) biologiquement actifs.

Pour les études de toxicocinétique, le penflufen est marqué au ¹⁴C sur le noyau pyrazole ou phényle. Les études de toxicocinétique sont réalisées chez le rat *via* une exposition unique par gavage à des doses de 2 et 200 mg/kg pc ou de 3,7 et 5,1 mg/kg pc, selon les expériences, par gavage dans une suspension aqueuse de 0,5% de tragacathe.

Le penflufen est une substance très bien absorbée aux doses d'exposition utilisées (> 90%). À la dose de 200 mg/kg pc, le pic plasmatique de radioactivité est observé après 1,5 heures, avec une concentration environ 25 fois supérieure à celle retrouvée pour la dose de 2 mg/kg pc. Les résultats sont similaires entre les deux types de marquage.

La distribution dans les organes est établie par autoradiographie (marquage phényle) suite à une exposition de 3,7 mg/kg pc pour les mâles et 5,1 mg/kg pc pour les femelles sur une

période de 1 à 168 heures. Les concentrations les plus fortes sont observées dans le foie (4,5/4,6 µg eq/g pour les mâles et les femelles, respectivement), le rein (2,8/2,9 µg eq/g, pour les mâles et les femelles, respectivement) et les surrénales (1,2/3 µg eq/g pour les mâles et les femelles, respectivement) 1 heure après traitement. Après 24 heures, il est retrouvé une valeur inférieure à 0,32 µg eq/g dans les organes et tissus. Le marquage du noyau pyrazole aboutit à des résultats similaires. Les concentrations diminuent rapidement et il n'y a pas d'accumulation dans les organes.

Concernant le métabolisme, de nombreux métabolites sont observés mais aucun ne dépasse 10% de la radioactivité administrée. Avec le marquage sur le noyau pyrazole, les principaux métabolites sont des produits déméthylés : 68% de la dose administrée représentent des métabolites identifiés, 20% des métabolites non-identifiés et 0,47% est retrouvée sous forme du parent dans les fèces. Avec le marquage sur le noyau phényle, la plupart des métabolites sont pour partie des produits de déméthylation et l'hydroxylation est aussi un processus majeur du métabolisme : 58 à 94% de la dose administrée sont retrouvés dans des métabolites identifiés et moins de 2% du parent est détecté dans le plasma, le foie et le rein.

Chez les rats mâles canulés, l'excrétion biliaire est rapide (37% en 4 heures) ce qui suggère un effet de premier passage hépatique susceptible de réduire l'exposition post-hépatique du penflufen et/ou de ces métabolites. Cependant, en fin d'étude, la radioactivité résiduelle retrouvée dans le corps est de 0,3% pour les deux sexes, 72 heures après traitement.

Le penflufen est très rapidement éliminé (37% dans les 4 heures post-traitement). A la dose de 2 mg/kg pc (marquage phényle), une différence est observée entre les mâles et femelles avec une excrétion dans les urines et fèces de 28 et 67 % pour les mâles et de 47 et 49% pour les femelles. Le pic de radioactivité plasmatique est observé à 0,67 et 1 heure après le traitement chez les mâles et femelles. L'exposition à la dose de 200 mg/kg pc conduit à une élimination de 34% dans les urines et 61% dans les fèces chez les mâles. Après 72 heures, 0,6% de la radioactivité reste associée au corps (en excluant le tractus digestif).

6.11.2 Revue des valeurs de référence

6.11.2.1 AOEL

6.11.2.1.1 *Description de l'AOEL*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude d'1 an (OCDE 452) conduite chez le chien par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 4 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 200, 1000 ou 10000 ppm de penflufen, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 6,8 ; 32 ou 357 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 7,7 ; 38 ou 425 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont une augmentation du poids absolu du foie (statistiquement significatif chez les femelles) ainsi qu'une hypertrophie hépatocellulaire centrolobulaire diffuse (1/4 femelle). La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 ppm et 200 ppm chez les femelles (10000 et 1000 ppm chez les mâles).

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les femelles de 7,7 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,077 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.11.2.1.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Bien qu'une étude à 90 jours (durée adaptée pour la dérivation d'une AOEL) chez le chien aboutisse à une NOAEL de 6,1 mg/kg pc/j (180 ppm), la valeur de 7,7 mg/kg pc/j (200 ppm) est obtenue dans l'étude sur 1 an. Ceci peut s'expliquer par les gammes et les écarts de doses dans ces études (180, 1800, 18000 ppm dans l'étude sur 90 jours versus 200, 1000, 10000 ppm dans l'étude sur 1 an).

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études de toxicologie sont disponibles. Cependant, il y a beaucoup d'imprécisions et des études déviant des lignes directrices dans ce dossier.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les atteintes hépatiques sont retrouvées dans toutes les études et espèces investiguées, les lésions progressant avec la dose. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain, conclusion renforcée d'une part par une atteinte observée chez différentes espèces et d'autre part par une activation du récepteur nucléaire CAR/PXR et de son dialogue avec différents récepteurs nucléaires (GR, PPAR α , LXR, ER).
- **le choix de l'étude clé** : l'étude sur un an chez le chien est sélectionnée. Celle-ci est jugée de qualité suffisante pour dériver une AOEL (4 chiens par dose) malgré des écarts importants entre les doses.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 37: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Hypertrophie hépatique (étude 1 an chez le chien)	7,7	100 (pas de correction par l'absorption orale)	0,077	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.11.2.2 DJA

6.11.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de cancérogénicité sur 2 ans (OCDE 453) conduite chez le rat.

Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 100, 2000 et 7000 ppm de penflufen, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 4 ; 79 ou 288 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 5,6 ; 113 ou 399 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont :

- une atteinte hépatique chez les deux sexes, incluant une hypertrophie hépatocellulaire centrolobulaire à panlobulaire, des pigments bruns et des foci éosinophiles ;
- une altération de la colloïde au niveau de la thyroïde chez les femelles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 2000 ppm et 100 ppm pour les mâles et les femelles.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 4 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,04 mg/kg pc/j.

6.11.2.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Il y a cependant un questionnement sur le faible taux de survie chez les rats mâles dans l'étude à 2 ans soit 31% pour les contrôles et 40%, 35% et 43% pour les animaux exposés à 100, 2000 et 7000 ppm de penflufen. Cette forte mortalité n'est pas commentée dans le dossier réglementaire.

Un niveau de confiance global **moyen-fort** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il existe deux études de toxicologie en exposition chronique, soit 2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont une altération de la colloïde des follicules thyroïdiens et une hypertrophie hépatique. Ces effets sont considérés transposables à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude long terme est pertinente pour dériver cette DJA. L'étude rapporte une forte mortalité sans recherche d'une cause sous-jacente.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé a permis d'identifier un couple LOAEL/NOAEL. Il s'agit de la NOAEL la plus basse observée dans des études chroniques.

Tableau 38: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le foie (incluant une hypertrophie) et sur la thyroïde (incluant une altération de la colloïde)	4	100	0,04	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen fort			

(étude 2 ans chez le rat)				
---------------------------	--	--	--	--

6.11.2.3 ARfD

6.11.2.3.1 *Description de l'ARfD*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de neurotoxicité aiguë (OCDE 424) réalisée chez le rat par voie orale.

Dans l'étude initiale, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont reçu une dose unique de 0, 100, 500 ou 1000 mg/kg pc de penflufen par gavage. Dans une étude complémentaire (« follow-up study »), des groupes de 12 femelles ont reçu des doses de 0, 25 ou 50 mg/kg pc de penflufen par gavage.

Dans l'étude initiale, l'effet critique est une baisse statistiquement significative de l'activité locomotrice le jour de l'exposition. La LOAEL pour cet effet critique est fixée à 500 mg/kg pc pour les mâles et 100 mg/kg pc pour les femelles. Cette étude ne permet donc pas d'identifier une NOAEL pour les femelles.

L'étude complémentaire, faites à des doses inférieures ne rapporte pas d'effet neurotoxique à la dose maximale testée de 50 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 50 mg/kg pc. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,5 mg/kg pc.

6.11.2.3.2 *Analyse critique du GT*

Le rapport d'étude a été revu par le GT pour une meilleure compréhension des résultats consignés dans le DAR. Suite à l'étude initiale qui aboutit à une LOAEL chez les femelles à la plus faible dose (100 mg/kg pc), l'étude complémentaire (« follow-up study ») a été réalisée seulement chez les femelles aux doses de 25 et 50 mg/kg pc. L'étude secondaire ne montre aucun effet aux deux doses testées conduisant à une NOAEL équivalente à 50 mg/kg pc. Cependant, les 12 femelles par dose ont été sacrifiées un à deux jours après le traitement ce qui ne correspond pas à la ligne directrice de l'OCDE n°424. Aucune nécropsie n'a été réalisée et les tests fonctionnels inhérents à ce type d'étude n'ont pas été effectués au-delà du jour d'exposition comme il est requis par la ligne directrice. Le GT considère que cette étude complémentaire ne peut pas être prise en compte dans l'établissement de l'ARfD.

Le GT recommande d'utiliser la LOAEL pour la diminution de l'activité locomotrice à partir de l'étude de neurotoxicité aiguë initiale (100 mg/kg pc) et d'appliquer un facteur d'incertitude de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour l'utilisation d'une LOAEL comme point de départ). La valeur de l'ARfD serait donc fixée à 0,33 mg/kg pc au lieu de 0,5 mg/kg pc, telle qu'établie actuellement.

Un niveau de confiance global **moyen faible** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études de toxicologie sont disponibles dans le dossier.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet critique retenu est une baisse de l'activité locomotrice après exposition aiguë par gavage. Ces effets sont considérés par défaut comme transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas décrit.

- **le choix de l'étude clé** : le type d'étude est adapté pour dériver une ARfD. Cependant, l'étude complémentaire est menée avec des déviations par rapport à la ligne directrice de l'OCDE. C'est la raison pour laquelle seule l'étude principale est retenue par le GT.
- **le choix du point de départ** : seule une LOAEL est identifiée dans l'étude initiale.

Tableau 39: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le penflufen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Effets cliniques, diminution de l'activité et de la température dans l'étude initiale de neurotoxicité aiguë chez le rat (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat – follow-up)	50	100	0,5	Diminution de l'activité locomotrice (étude de neurotoxicité aiguë chez le rat – étude initiale)	Pas de NOAEL LOAEL = 100	300 (LOAEL-NOAEL)	0,33 Moyen faible

6.11.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Différence de toxicité entre les énantiomères

Un article rapporte une toxicité différentielle des énantiomères. Il est montré qu'il y a une différence de toxicité (50 fois) entre S-(+) et R-(-) sur la base des DL₅₀²⁴ pour différentes espèces (*Danio rerio* et 4 phytopathogènes) avec une explication reposant sur une analyse de docking moléculaire (Di et al. 2021).

Quantité et qualité des données

Concernant les données produites par les industriels, celles-ci sont sujettes aux constatations suivantes :

- Dans certaines études, des déviations méthodologiques ont été constatées (par exemple, déviations par rapport à la ligne directrice de l'OCDE 424, non respect des écarts de doses dans les expérimentations chroniques...).
- Il n'y a souvent pas d'analyse des effets des métabolites et des énantiomères. Dans le cas présent, il n'y a pas de données toxicologiques sur le métabolite M01 (penflufen-3-hydroxy-butyl-glycoside) bien qu'il soit susceptible de dépasser la valeur réglementaire dans les eaux souterraines.

Toxicité hépatique

Pour le foie, des effets sont observés dans plusieurs études à des doses qui sont inférieures aux seuils de classification selon le règlement CLP. En effet, dans une étude de 28 jours chez

²⁴ Dose induisant 50% de létalité chez les animaux testés

le rat, une augmentation statistiquement significative du poids relatif chez le mâle et une hypertrophie des hépatocytes en région centrolobulaire (2/5 mâles versus 0/5 chez les contrôles) sont observées dès la dose de 154 mg/kg pc/j. Les mêmes effets sont observés dans l'étude de 28 jours chez le chien à une dose de 244 mg/kg pc/j. Pour cette durée d'étude, le seuil de classification selon le règlement CLP pour la toxicité spécifique pour certains organes cibles après exposition répétée (STOT RE) de catégorie 2 est entre 30 et 300 mg/kg pc/j. Dans l'étude de 90 jours chez le chien, une hypertrophie hépatique est observée chez 50% des chiens (1/4 mâle et 3/4 femelles *versus* 0 chez les contrôles) exposés à la dose de 1800 ppm (soit 55,77 - 63,1 mg/kg pc/j). Cependant il est difficile de conclure en raison du faible nombre d'animaux par groupe. Pour cette durée d'étude, le seuil de classification pour STOT RE 2 est entre 10 et 100 mg/kg pc/j. L'étude de 2 ans par gavage chez le rat montre une augmentation statistiquement significative de l'hypertrophie hépatocellulaire centrolobulaire chez les mâles dès 4 mg/kg pc/j. En comparaison le seuil de classification est entre 1,25 et 12,5 mg/kg pc/j pour cette durée d'étude. La conclusion du RAC (2018) est qu'il ne s'agissait pas d'effets néfastes sévères mais de réponses adaptatives et qu'une classification n'est pas justifiée. Le GT s'interroge sur une absence de classification STOT RE 2 pour le foie.

Neurotoxicité

Pour la neurotoxicité, l'étude en dose unique par gavage chez le rat montre une atteinte locomotrice dès 100 mg/kg pc/j pour les femelles, 500 mg/kg pc/j chez les mâles, une ataxie, une démarche anormale et une réduction de l'activité à 500 mg/kg pc/j chez les femelles. Ces effets disparaissent dans les 3 jours. La conclusion du RAC (2018) est qu'il n'y a pas de preuve convaincante de neurotoxicité aiguë et qu'une classification n'est pas justifiée. Le GT s'interroge sur une absence de classification STOT SE3²⁵ qui aurait pour objectif de couvrir des atteintes transitoires du système nerveux central.

Cancérogénèse

Des études chez le rat à 2 ans et sur la souris à 1,5 an ont été réalisées. Chez le rat, on observe des adénomes hépatocellulaires et des adénomes ovariens chez les femelles, des astrocytomes et des sarcomes histiocytaires chez les mâles. Chez la souris, on observe des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires chez les mâles. Ces différents effets sont statistiquement significatifs et/ou observés avec une incidence supérieure à celle des contrôles historiques.

L'étude de cancérogenèse chez le rat pose la question de sa conduite. En effet, la survie des mâles dans les contrôles est de 25/60 (42%) à 2 ans, et elle est similaire aux différentes doses testées (42, 38 et 42%). Chez les femelles, la mortalité est plus élevée dans le groupe contrôle (31/60, soit 51% de survivantes) que dans les groupes traités aux différentes doses testées (62, 73 et 72% de survivantes). Les valeurs des survies de 73% et 72% (exposition 2000 et 7000 ppm) sont significativement différentes du contrôle. Il n'y a pas d'explication fournie pour cette mortalité excessive qui en outre est plus importante dans le groupe contrôle femelle que dans les groupes traités.

Sur la base des résultats chez le rat et la souris, le penflufen est classé cancérogène de catégorie 2 (susceptible de provoquer le cancer). Le GT note que lors de la consultation publique préliminaire sur la proposition de classification, deux États-Membres ont soutenu cette classification mais auraient considéré le classement en catégorie 1B plus approprié.

²⁵ Peut provoquer somnolence ou vertiges

6.12 Penthiopyrad

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2012), des conclusions de l'EFSA (2013 & 2022) et de l'opinion du RAC (2015). De plus, les rapports des études sur deux générations et de tératogénicité ont été consultés. Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.12.1 Partie toxicocinétique

Pour les études de toxicocinétique, le penthiopyrad est marqué au ^{14}C sur le noyau pyrazole ou thiennyl. Elles sont réalisées chez le rat *via* une exposition unique à la dose de 10 ou 100 mg/kg pc par gavage dans une suspension aqueuse de 10% de tween 80.

Le penthiopyrad est absorbé à plus de 83%. Le Tmax plasmatique se situe entre 30 et 80 min et les Cmax varient de 3,60 à 32,88 $\mu\text{g-eq/g}$ pour les femelles et de 1,35 à 12,43 $\mu\text{g-eq/g}$ pour les mâles aux doses de 10 et 100 mg/kg pc, respectivement. Des valeurs comparables sont retrouvées pour les deux molécules marquées.

Le penthiopyrad est largement distribué dans l'organisme. La concentration maximale est atteinte après une heure dans le foie principalement, ainsi que dans le tissu adipeux, les ganglions lymphatiques, les corticosurrénales, le pancréas, les reins, la vessie et le tractus gastro-intestinal. Les concentrations dans ces tissus sont supérieures à la concentration plasmatique.

Le penthiopyrad est très métabolisé. On retrouve près d'une quarantaine de métabolites oxydés, réduits, conjugués et clivés. Certains de ces métabolites ont été identifiés notamment: PAM (1-methyl-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide), PCA (1-methyl-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid), DM-PCA (3-trifluoromethyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid), 753-A-OH (N-[2-(3-hydroxy-1,3-dimethyl-butyl) thiophen-3-yl]-1-methyl-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide), 753T-DO (N-[5-hydroxy-5-(1,3-dimethylbutyl)-2-oxo-2,5-dihydrofuran-4-yl]-1-methyl-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide) (ces 2 derniers étant particulièrement présents dans la bile).

Le temps de demi-vie sanguin est indépendant de la dose et du sexe et varie de 13,6 heures à 21,4 heures. L'élimination du penthiopyrad et de ses métabolites se fait essentiellement par voie biliaire et fécale avec des pourcentages variant de 62,8 à 81% dans les deux sexes en 72h. La voie urinaire est minoritaire et varie entre 5,0 à 18,3%.

6.12.2 Revue des valeurs de référence

6.12.2.1 AOEL

6.12.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude réalisée sur 2 générations (OCDE 416) chez le rat par voie orale.

Pour cette étude, des groupes de 24 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 200, 1000 ou 5000 ppm de penthiopyrad. Les équivalences en mg/kg pc/j sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 40 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j

	Mâles	Femelles

	200 ppm	1000 ppm	5000 ppm	200 ppm	1000 ppm	5000 ppm
Génération P	11,0	54,0	278	18,1	90,5	439
Génération F1	12,8	64,2	340	19,0	95,6	480

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont :

- une diminution du gain de poids corporel chez les mâles de la génération F1,
- une augmentation du poids relatif du foie chez les femelles des générations P et F1,
- une augmentation du poids relatif des surrénales avec une hypertrophie corticale des surrénales chez les femelles de la génération F1 (10/24).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 ppm et 200 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 11 mg/kg pc/j pour la toxicité parentale. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,1 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.12.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR selon le GT, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : les études conduites chez plusieurs espèces respectent les lignes directrices de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : il s'agit d'effets sur le poids corporel, les surrénales et le foie chez la génération P et F1. Ces effets sont extrapolables à l'humain par défaut.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude sur deux générations est d'une durée adaptée pour dériver une AOEL. Cette étude suivant les requis réglementaires est de qualité acceptable.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé permet d'identifier un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 41: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effets sur le poids, le foie et les	11	100	0,1	Maintien de la VTR actuelle			

surrénales dans la génération P et F1. (étude multigénérationnelle chez le rat)		(pas de correction par l'absorption orale)		Niveau de confiance : Moyen
--	--	--	--	-----------------------------

6.12.2.2 DJA

6.12.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude réalisée sur 2 générations (OCDE 416) chez le rat par voie orale.

Pour cette étude, des groupes de 24 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 200, 1000 ou 5000 ppm de penthiopyrad. Les équivalences en mg/kg pc/j sont détaillées dans le tableau suivant.

Tableau 42 : Moyenne des expositions en mg/kg pc/j

	Mâles			Femelles		
	200 ppm	1000 ppm	5000 ppm	200 ppm	1000 ppm	5000 ppm
Génération P	11,0	54,0	278	18,1	90,5	439
Génération F1	12,8	64,2	340	19,0	95,6	480

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont :

- une diminution du gain de poids corporel chez les mâles de la génération F1,
- une augmentation du poids relatif du foie chez les femelles des générations P et F1
- une augmentation du poids relatif des surrénales avec une hypertrophie corticale des surrénales chez les femelles de la génération F1 (10/24).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 1000 ppm et 200 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL de 11 mg/kg pc/j pour la toxicité parentale. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,1 mg/kg pc/j.

6.12.2.2.2 Analyse critique du GT

Une étude de cancérogénicité a été réalisée chez le rat (OCDE 451). Pour cette étude, des groupes de 50 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant du penthiopyrad pendant 2 ans avec des doses cibles de 0, 9, 27, 83 ou 250 mg/kg pc/j.

Le GT constate que les rats mâles présentent des altérations de la fonction rénale, à savoir une augmentation statistiquement significative de l'incidence de pyélite (8/50 animaux) et des signes de néphropathie chronique (41/50 animaux) dès la plus faible dose testée de 9 mg/kg pc/j. La néphropathie chronique étant irréversible, elle doit être prise en compte comme effet critique selon le GT. L'analyse de cette étude a conduit le GT à retenir une LOAEL à 9 mg/kg pc/j, dose plus basse que celle issue de l'étude clé choisie pour la dérivation de la DJA. Il est à noter que, dans le dossier réglementaire, la dose de 27 mg/kg pc/j a été retenue comme

NOAEL pour cette étude car les effets rénaux n'ont pas été retenus comme effet adverse. La dose de 9 mg/kg pc/j est la plus faible ayant été testée dans cette étude de cancérogénicité, mais aussi dans l'ensemble des autres études présentées dans le dossier réglementaire.

Dans ce contexte, l'étude de cancérogénicité est plus protectrice que celle retenue pour la DJA actuelle. Ainsi, le GT recommande de réviser la DJA pour une valeur de 0,03 mg/kg pc/j sur la base de la LOAEL de 9 mg/kg pc/j pour les effets rénaux et issue de l'étude de cancérogénicité chez le rat, avec application d'un facteur d'incertitude total de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour l'utilisation d'une LOAEL comme point de départ).

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité dans le corpus de données** : les études conduites chez plusieurs espèces respectent les lignes directrices de l'OCDE. Des expériences complémentaires sur les effets rénaux plus sensibles (voir RECO 1) auraient pu être conduites pour caractériser plus finement la néphrotoxicité.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : deux paramètres de néphrotoxicité (pyélite et néphropathie chronique) sont statistiquement significativement plus élevés à la dose la plus faible de 9 mg/kg pc/j comparés au groupe témoin. La néphrotoxicité s'amplifie, avec une augmentation des paramètres affectés, à plus fortes doses. Sachant le caractère irréversible de la néphropathie, cet effet néfaste est à prendre en compte pour l'établissement de l'AOEL. Cette pathologie est pertinente pour l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de cancérogénicité chez le rat est retenue comme étude clé. Sa durée est adaptée pour dériver une DJA. Cette étude suivant les requis réglementaires est de qualité suffisante pour dériver une DJA malgré un choix des doses discutables et un manque de caractérisations fonctionnelles de la néphropathie chronique.
- **le choix du point de départ** : l'étude clé permet d'identifier uniquement une LOAEL. Il n'y a pas de NOAEL car la néphrotoxicité est rapportée dès la plus faible dose testée.

Tableau 43: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Effet sur le poids corporel, les surrénales et le foie chez les parents. (étude multigénérationnelle chez le rat)	11	100	0,1	Effets sur les reins (étude sur 2 ans chez le rat)	Pas de NOAEL LOAEL = 9	300 (LOAEL–NOAEL)	0,03 Moyen

6.12.2.3 ARfD6.12.2.3.1 *Description de l'ARfD*

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité pour le développement prénatal réalisée chez le lapin (OCDE 414).

Dans cette étude, des groupes de 24 femelles ont reçu des doses de 0, 25, 75 ou 225 mg/kg pc/j de penthiopyrad par gavage entre le 6^{ème} et le 28^{ème} jour de gestation.

L'effet critique est une réduction du poids corporel du fœtus (statistiquement significative chez les femelles). La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 225 mg/kg pc/j et 75 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 75 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle chez l'humain), l'ARfD établie est de 0,75 mg/kg pc.

6.12.2.3.2 *Analyse critique du GT*

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen fort** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : les études conduites chez plusieurs espèces (rat, lapin) respectent les lignes directrices de l'OCDE.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : la baisse du poids corporel fœtal est l'effet critique retenu. Cet effet est transposable à l'humain.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude sur le développement chez le lapin, retenue comme étude clé, est jugée de bonne qualité et présente une durée adaptée pour dériver une ARfD.
- **le choix du point de départ** : l'étude permet d'identifier un couple NOAEL/LOAEL

Tableau 44: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le penthiopyrad

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Diminution du poids fœtal. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	75	100	0,75	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance: Moyen fort			

Une position divergente concernant l'ARfD retenue par le GT pour le penthiopyrad est présentée en annexe.

6.12.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Toxicité sur la reproduction et le développement

Dans l'étude sur deux générations chez le rat, des effets sur le poids corporel, un léger retard dans la séparation préputiale, une hypertrophie corticale des surrénales et une diminution du poids du thymus sont observés dans la descendance à la plus forte dose de 5000 ppm (278 mg/kg/day).

Dans l'étude de toxicité prénatale chez le lapin New Zealand, exposé par gavage à 0, 25, 75 ou 225 mg/kg pc/j, des malformations oculaires sont rapportées (voir tableau). La rétine est un tissu dans lequel la voie du succinate est majoritaire, suggérant que ce tissu serait particulièrement sensible aux inhibiteurs de la SDH (Bisbach et al. 2020; Hass et al. 2022)(cf section 0). Uniquement à la dose la plus faible de 25 mg/kg pc/j, 4 fœtus issus de 2 portées différentes, présentaient des yeux partiellement ouverts, dont l'un des 4 présentant une hydrocéphalie et une microphthalmie avec des replis rétinien bilatéraux associés. Il est conclu dans le dossier réglementaire que les malformations des paupières sont dans la gamme des contrôles historiques et donc, sans lien avec le traitement.

Tableau 45 : Occurrence des malformations oculaires chez le lapin New Zealand dans les différentes conditions de traitement (0 à 225 mg/kg pc/j) et en relation avec les données de la littérature (a : Ema *et al.*, 2012 et b : contrôles historiques de l'éleveur).

	0	25	75	225	Données contrôles
Paupières ouvertes	6/225	4/206	0/207	0/195	0,29 ^a -2% ^b
Microphthalmie	0/225	1/206	0/207	0/195	2/4772 ^a
Replis rétinien	0/225	1/206	0/207	0/195	NR

Cependant, dans une étude pilote réalisée à 0, 250, 500 or 1000 mg/kg pc/j, la présence de 6 fœtus avortés (aucun détail n'est disponible sur le nombre total de fœtus dans le dossier réglementaire) avec des paupières ouvertes avait déjà été rapportée pour la dose à 500 mg/kg pc/j conduisant au choix de la gamme de concentrations utilisée dans les études ultérieures.

L'incidence importante des paupières ouvertes chez les contrôles de l'étude principale (2,7%) pose donc question. Même si celle-ci est dans la gamme de contrôle historique de l'éleveur (2%), elle est supérieure à celles retrouvées dans d'autres études sur cette souche de lapin (moyenne : 0,29%) (Ema *et al.* 2012).

De plus, et indépendamment des paupières ouvertes, une microphthalmie associée à des replis rétinien est présente chez 1 fœtus exposé à la dose la plus faible. Cette malformation n'est pas observée chez les contrôles. La prise en compte de la littérature suggère que la microphthalmie est un événement spontané rare chez le lapin New Zealand (0,02% selon Ema *et al.*, 2012). Les replis rétinien ne sont pas rapportés dans les données historiques (Ema *et al.*, 2012).

Une deuxième étude réalisée chez le rat Wistar par gavage à 0, 62,5, 250 et 1000 mg/kg pc/j, met en évidence chez le groupe témoin, des yeux de taille réduite chez 2 fœtus issus de 2 portées différentes (sur un total de 127 fœtus et 22 portées). A la dose la plus forte de 1000 mg/kg pc/j, 3 fœtus de 3 portées différentes présentent des yeux de taille réduite (sur un total de 108 fœtus et 21 portées). Ces événements néfastes ne sont pas relevés ni commentés dans le dossier réglementaire. Sur des fœtus de rat, l'évaluation des globes oculaires et l'analyse de la structure rétinienne nécessite une approche spécifique en raison de la taille des structures et des paupières closes.

Ces effets ne sont pas dose-reliés et ne ressortent pas significatif à l'analyse statistique. Cependant, par précaution et à la vue des effets oculaires observés avec d'autres SDHI, des investigations supplémentaires (par exemple, taille des globes oculaires, étude de neurotoxicité du développement), permettraient de clarifier la pertinence de ces effets (voir RECO1- Mise en place d'une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques).

6.13 Pydiflumetofen

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2018), des conclusions de l'EFSA (2019) et de l'opinion du RAC (2019). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.13.1 Partie toxicocinétique

Ce composé est présent sous la forme de deux énantiomères 50/50 (SYN546968/SYN546969) actifs.

Pour les études de toxicocinétique, le pydiflumetofen est marqué au ^{14}C sur le noyau pyrazole ou phényl. Les études sont réalisées chez le rat et la souris *via* une exposition unique à 5, 100, 300 ou 1000 chez le rat ou la souris, par gavage dans une suspension aqueuse de 0,5% de tween 80.

Le pydiflumetofen est absorbé à un pourcentage de 90%. Ce pourcentage d'absorption diminue à mesure qu'augmente la dose, avec 50-55% à la dose de 100 mg/kg pc et 19-24% à 300 mg/kg pc. Ceci suggère que l'augmentation de la dose administrée limite l'absorption. Le Tmax plasmatique se situe entre 0,5 à 1 heure pour une dose de 5 mg/kg et entre 24 et 30 heures pour 1000 mg/kg pc. La Cmax chez le rat est de 418 - 472 $\mu\text{g-eq/g}$ et de 20200 - 20600 $\mu\text{g-eq/g}$ pour des doses de 5 et 1000 mg/kg pc, respectivement, sans impact du sexe.

La distribution se fait dans tous les organes. Les plus fortes concentrations de radioactivité sont observées dans le foie et les reins à tous les points d'échantillonnage entre 0,5 heure et 120 heures. A certains points d'échantillonnage, des niveaux de radioactivité, supérieurs à ceux retrouvés dans le sang, sont observés dans les surrénales, la graisse rénale, le pancréas, la thyroïde et les poumons.

Chez le rat, des administrations orales répétées journalières sur une semaine ne montrent pas d'accumulation du pydiflumetofen à des doses entre 3 et 10 mg/kg pc/j. La même tendance est observée chez la souris.

Sur la base des résultats de plusieurs études, le métabolisme est quantitativement important avec plus de 95 % de la radioactivité totale correspondant à des métabolites. Chez le rat exposé à la dose de 5 mg/kg pc, le composé parent représente moins de 3,9 % dans l'urine. Les principales voies métaboliques sont : la déméthoxylation, la N-déalkylation, la mono et la dihydroxylation, la O-déméthylation et la déchloration oxydative et réductrice. La majorité de ces métabolites sont également mono et di-hydroxylés et, dans de nombreux cas, conjugués avec du glucuronide ou du glutathion.

Après une dose unique administrée par gavage chez les rats mâles et les femelles, environ 91 % de la radioactivité totale est excrétée dans les 48 heures. L'excrétion est complète à 168 heures, principalement dans les fèces *via* excrétion biliaire. Le profil d'excrétion montre que moins de 7,9 % d'une dose orale de 5 mg/kg pc est excrétée sous forme inchangée dans les fèces et le composé parent n'est pas présent dans la bile. Ce schéma d'excrétion est le même après injection intraveineuse de 1 mg/kg pc. La $T_{1/2}$ est inférieure à 2 heures après une administration intraveineuse. Chez la souris, la principale voie d'excrétion est les fèces (63-79

% à 10 mg/kg pc et 76-94 % à 300 mg/kg pc), l'élimination urinaire représentant le reste de la dose.

6.13.2 Revue des valeurs de référence

6.13.2.1 AOEL

6.13.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de toxicité pour le développement prénatal (OCDE 414) conduite chez le lapin par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 24 femelles ont reçu des doses de 0, 10, 100 ou 500 mg/kg pc/j de pydiflumetofen par gavage entre le 6^{ème} et le 27^{ème} jour de gestation.

L'effet critique est l'incidence accrue de variations squelettiques (cartilage costal interrompu ; effet statistiquement significatif en tenant compte de la portée) chez les fœtus. La LOAEL et la NOAEL pour cet effet critique sont de 100 mg/kg pc/j et 10 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL de 10 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,1 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.13.2.1.2 Analyse critique du GT

Le GT considère qu'il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études réalisées dans plusieurs espèces (lapin, rat) sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'incidence accrue de variations squelettiques observée dans l'étude de toxicité développementale chez le lapin est retenue comme effet critique. Cet effet est considéré comme transposable à l'humain. Le mode d'action est inconnu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de tératogénicité chez le lapin met en évidence des variations mais le volume 3B6 manque de précisions quant à la description de leur nature.
- **le choix du point de départ** : Il existe un couple LOAEL/NOAEL et le choix des doses était approprié.

Tableau 46: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)

							Niveau de confiance
Augmentation de variants squelettiques chez le foetus. (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	10	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,1	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.13.2.2 DJA

6.13.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de cancérogénicité sur 18 mois (OCDE 451) conduite chez la souris par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 50 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 75, 375 et 2250 ppm de pydiflumetofen, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 9,2 ; 45,4 ou 287,9 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 9,7 ; 48,4 ou 306,2 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques sont :

- une diminution statistiquement significative du poids corporel chez les mâles,
- une augmentation statistiquement significative de l'incidence de l'hypertrophie hépatocellulaire et des adénomes hépatocellulaires multiples chez les mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 375 ppm et 75 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 9,2 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,09 mg/kg pc/j.

6.13.2.2.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR selon le GT, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il existe plusieurs études de toxicologie dans le dossier.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques retenus sont une diminution du poids corporel et une augmentation de l'incidence des lésions hépatiques dans l'étude de cancérogenèse chez la souris. Il n'existe pas une convergence formelle avec les études long terme chez le rat. Ces effets ont un mode d'action inconnu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de cancérogénicité présente une durée adaptée et une qualité suffisante pour dériver une DJA.
- **le choix du point de départ** : l'étude a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 47: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Diminution du poids corporel et effets sur le foie (lésions histologiques) (étude 18 mois chez la souris)	9,2	100	0,09	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

6.13.2.3 ARfD

6.13.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de toxicité pour le développement prénatal (OCDE 414) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 24 femelles ont reçu des doses de 0, 10, 30 ou 100 mg/kg pc/j de pydiflumetofen par gavage entre le 6^{ème} et le 19^{ème} jour de gestation.

Les effets critiques sont une diminution statistiquement significative du gain de poids maternel et une réduction de la consommation alimentaire entre les 6^{ème} et 10^{ème} jour de gestation. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 100 mg/kg pc/j et 30 mg/kg pc/j.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 30 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,3 mg/kg pc.

6.13.2.3.2 Analyse critique du GT

Les contrôles historiques ont été utilisés dans le dossier réglementaire pour justifier la non pertinence d'effets sur le développement (malformations diverses) alors qu'il est d'usage de ne pas les utiliser dans ce but (sauf en génotoxicité) mais uniquement afin d'éclairer les résultats des groupes traités et témoin de l'étude. Ainsi, le GT considère que la NOAEL établie dans cette étude n'est pas suffisamment fiable. A la place, l'étude de toxicité développementale chez le lapin ayant servi à fixer l'AOEL serait plus appropriée pour dériver l'ARfD.

Le GT propose donc de fixer l'ARfD à 0,1 mg/kg pc, sur la base d'une NOAEL de 10 mg/kg pc/j pour l'incidence accrue des variations squelettiques dans l'étude de toxicité développementale chez le lapin, et en tenant compte d'un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle).

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études réalisées dans plusieurs espèces (lapin, rat) sont disponibles.

- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'incidence accrue de variations squelettiques observée dans l'étude de toxicité développementale chez le lapin, dont le mode d'action est inconnu, est retenu comme effet critique. Ces effets sont considérés comme transposables à l'humain. Leur mode d'action est inconnu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de toxicité développementale met en évidence des variations mais le volume 3B6 manque de précisions quant à la description de leur nature.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple LOAEL/NOAEL et le choix des doses était approprié.

Tableau 48: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le pydiflumetofen

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Diminution du gain de poids maternel et de la consommation alimentaire. (étude de toxicité prénatale chez le rat)	30	100	0,3	Variations squelettique chez les foetus (étude de toxicité prénatale chez le lapin)	10	100	0,1 Moyen

6.14 Sedaxane

Les études présentées ci-dessous proviennent du dossier réglementaire. Les informations rapportées et commentées ci-dessous proviennent principalement des volumes 1 et 3B6 (2012) et des conclusions de l'EFSA (2013) et de l'opinion du RAC (2019). Aucune nouvelle publication, pouvant être utilisée comme base d'une VTR, n'a été identifiée dans la littérature.

6.14.1 Partie toxicocinétique

Ce composé est présent sous la forme d'isomères : le cis (84,6%) et le trans (15,4%) dont les propriétés pharmaco- et toxicocinétiques sont comparables, selon le dossier réglementaire, sur la base d'un nombre limité de tests.

Pour les études de toxicocinétique, le sedaxane est marqué au ¹⁴C sur le noyau pyrazole ou phényle. Ces études sont conduites chez le rat *via* une exposition unique à 1 ou 80 mg/kg pc, par gavage dans de l'huile de maïs. Une étude d'exposition répétée avec une dose de 1 mg/kg pc/j est conduite pendant 14 jours.

La fraction absorbée varie entre 87 et 94%, celle-ci ne semble pas être influencée par la position du marquage, par la dose ou par le sexe. Le T_{max} varie entre 1 à 5 heures et ne semble pas influencé par le sexe ni être saturable aux doses utilisées. Le C_{max} varie de 0,11 à 11 µg eq./g de tissu pour les doses de 1 et 80 mg/kg pc, respectivement.

Dans l'étude par dose unique à la dose de 1 mg/kg pc, la substance se distribue dans tout l'organisme dans les 1,5 heures. Les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans le foie (1,03 µg eq./g de tissu) et le rein (0,21 µg eq./g de tissu), 1,5 heure après l'exposition. Des résultats similaires sont retrouvés après une exposition unique à 80 mg/kg pc (71,74 µg eq./g de tissu pour le foie et 35,18 µg eq./g de tissu pour les reins, 5 heures après l'exposition). Aucun impact du sexe n'est noté. Le niveau de radioactivité est négligeable après 168 h post-exposition.

Le sedaxane est largement métabolisé chez le rat. Les mécanismes impliqués sont la déméthylation, l'hydroxylation, l'oxydation et la conjugaison. Pas moins de 19 métabolites sont identifiés.

La demi-vie d'élimination terminale est estimée à 22 et 28,8 heures aux doses d'exposition de 1 et 80 mg/kg pc, respectivement, pour les deux sexes. L'excrétion biliaire est estimée entre 75-88% de la radioactivité administrée après 48 heures. Le sedaxane, ou ses métabolites, sont excrétés principalement dans les selles à 75-88% de la radioactivité administrée après 96 heures. L'excrétion urinaire varie de 12-20% de la radioactivité administrée après 96 heures.

Enfin, après administration répétée, la distribution se fait dans la plupart des tissus (principalement le foie et les reins) avec un plateau observé après 14 jours. A l'exception du foie, des reins et de la rate, les concentrations tissulaires ne sont plus détectables, 48 jours après l'exposition.

6.14.2 Revue des valeurs de référence

6.14.2.1 AOEL

6.14.2.1.1 Description de l'AOEL

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'AOEL est une étude de 90 jours (OCDE 408) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 10 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 300, 2000 ou 4000 ppm de sedaxane, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 24,8 ; 168 ou 325 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 28,3 ; 186 ou 349 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont :

- une diminution du poids corporel chez les femelles,
- une diminution de la force d'agrippement (« *fore grip strength* ») chez les femelles (effet aussi retrouvé chez les mâles à cette dose mais pas à la dose supérieure).

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 2000 ppm et 300 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de l'AOEL est la NOAEL chez les femelles de 28,3 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'AOEL établie est de 0,28 mg/kg pc/j. Aucune correction n'a été apportée concernant l'absorption orale, car elle est supérieure à 80%.

6.14.2.1.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette AOEL en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études sur différentes espèces sont disponibles.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : l'effet retenu comme effet critique est une diminution du poids corporel et de la force d'agrippement. Des effets partiellement comparables sont observés dans plusieurs espèces (rat, chien, souris). Ces effets sont considérés comme transposables à l'humain. Leur mécanisme d'action n'est pas connu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude de toxicité subchronique (90 jours) chez le rat, par voie orale, réalisée dans les conditions prévues par les lignes directrices est retenue comme étude clé. Sa durée est adaptée pour dériver une AOEL.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 49: Etablissement de l'AOEL actuelle et de celle retenue par le GT pour le sedaxane

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude (absorption orale)	AOEL (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Diminution du poids corporel, diminution de la force d'agrippement. (étude 90 jours chez le rat)	28	100 (pas de correction de l'absorption orale)	0,28	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : moyen			

6.14.2.2 DJA

6.14.2.2.1 Description de la DJA

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude de cancérogénicité sur 2 ans (OCDE 453) conduite chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes de 52 animaux de chaque sexe ont consommé des aliments contenant 0, 200, 1200 ou 3600 ppm de sedaxane, ce qui correspond à des expositions à 0 ; 11 ; 67 ou 218 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 14 ; 86 ou 261 mg/kg pc/j pour les femelles.

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont :

- une diminution du poids et du gain de poids corporel chez les femelles,
- une augmentation du poids absolu et/ou relatif du foie dans les deux sexes, associée à des effets histologiques (hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires) chez les mâles,
- des altérations de la thyroïde : hypertrophie des cellules folliculaires chez les mâles à 52 semaines, colloïde basophile et desquamation de l'épithélium folliculaire chez les femelles à 104 semaines.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets sont de 1200 ppm et 200 ppm pour les deux sexes.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL de 11 mg/kg pc/j chez les mâles. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,11 mg/kg pc/j.

6.14.2.2.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Un niveau de confiance global **moyen faible** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : plusieurs études sur plusieurs espèces sont disponibles. Néanmoins, le corpus de données est de faible qualité avec des effets non pris en compte et une utilisation des contrôles historiques inappropriée. Ces points ont été relevés par l'Etat membre rapporteur et arbitrés.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques retenus sont une diminution du poids corporel et des lésions hépatiques et thyroïdiennes. Les effets hépatiques sont également observés dans d'autres études. Ces effets sont considérés par défaut comme transposables chez l'humain. Leur mécanisme d'action est inconnu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est de faible qualité. Sa durée est adaptée à la dérivation d'un DJA.
- **le choix du point de départ** : cette étude a permis d'identifier un couple NOAEL/LOAEL.

Tableau 50: Etablissement de la DJA actuelle et de celle retenue par le GT pour le sédaxane

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc/j)	Facteur d'incertitude	DJA (mg/kg pc/j) Niveau de confiance
Diminution du poids corporel, effets sur le foie et sur la thyroïde (étude 2 ans chez le rat)	11	100	0,11	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen faible			

6.14.2.3 ARfD

6.14.2.3.1 Description de l'ARfD

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de l'ARfD est une étude de neurotoxicité aiguë (OCDE 424) réalisée chez le rat par voie orale.

Dans cette étude, des groupes 10 animaux de chaque sexe ont reçu des doses uniques de 0, 30, 250 ou 2000 mg/kg pc de sedaxane par gavage.

Les effets critiques (statistiquement significatifs) sont une augmentation des observations cliniques (ex. réduction de l'activité et des redressements) chez les deux sexes le jour de l'exposition ainsi une baisse de l'activité locomotrice et de la force d'agrippement chez les femelles. La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 250 mg/kg pc et 30 mg/kg pc.

Le point de départ pour l'élaboration de l'ARfD est la NOAEL de 30 mg/kg pc. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), l'ARfD établie est de 0,3 mg/kg pc.

6.14.2.3.2 Analyse critique du GT

Selon le GT, il n'y a pas lieu de remettre en cause cette VTR, sur la base des données disponibles au moment de l'expertise.

Le GT note qu'au cours de cette étude, 3 femelles et 4 mâles du groupe exposé à la dose maximale ont été sacrifiés après 6 heures en raison d'une très forte toxicité (animaux moribonds).

Le GT note que la dose de 30 mg/kg pc est déjà associée à des effets statistiquement significatifs (diminution du poids corporel entre le premier jour et le 8^{ème} jour d'observation chez les mâles, diminution de la force d'agrippement des pattes postérieures au 15^{ème} jour d'observation chez les femelles). Ces effets n'ont pas été retenus, notamment, en raison de l'absence de relation dose-réponse et d'un constat d'une activité locomotrice déjà augmentée chez les femelles lors de la phase d'acclimatation avant le début du traitement.

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (Anses 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il s'agit du corpus habituel dans un dossier réglementaire.
- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets retenus sont une réduction de l'activité locomotrice et de la force d'agrippement ainsi que des effets cliniques. Ces effets sont considérés par défaut comme transposable à l'humain. Leur mécanisme d'action n'est pas connu.
- **le choix de l'étude clé** : l'étude clé est une étude de neurotoxicité aiguë. Elle présente une mortalité importante dans le groupe des animaux exposés à la plus forte dose. De plus, la batterie de tests neurologiques est jugée limitée. Sa durée est adaptée pour dériver une ARfD.
- **le choix du point de départ** : il existe un couple LOAEL/NOAEL.

Tableau 51: Etablissement de l'ARfD actuelle et de celle retenue par le GT pour le sedaxane

Dossier réglementaire				Conclusion du GT SDHI sur la base des données actuelles			
Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc)	Effet critique (étude clé)	Dose critique (mg/kg pc)	Facteur d'incertitude	ARfD (mg/kg pc) Niveau de confiance
Signes cliniques, diminution de l'activité locomotrice et de la force d'agrippement	30	100	0,3	Maintien de la VTR actuelle Niveau de confiance : Moyen			

(étude de neurotoxicité aiguë chez le rat)				
--	--	--	--	--

6.14.3 Points d'attention spécifiques à la substance

Cancérogénicité

La cancérogénicité, largement discutée lors de l'étude réglementaire du dossier du sedaxane, est considérée comme possible, notamment en raison des adénocarcinomes utérins, et a conduit à une classification Carc.2 selon le règlement CLP.

6.15 Synthèse du GT concernant la toxicocinétique et les VTR des SDHI

Observations transversales de la toxicocinétique

Les SA SDHI ont des taux d'absorptions variables, mais sont majoritairement bien absorbées dans une proportion variant de 50 à 95%. Pour certains, la fraction absorbée semble dépendante de la dose, c'est à dire saturable en fonction de l'augmentation de la concentration. La partie non absorbée reste dans le tractus gastro-intestinal pour être éliminée dans les fèces et contribue au pourcentage du composé parent mesuré dans les fèces.

La fraction absorbée de radioactivité est rapidement distribuée dans tous les tissus de l'organisme. La distribution comprend à la fois les parents et les métabolites, car ces derniers n'ont pas été identifiés et quantifiés durant les études de toxicocinétique. De plus, la position du ¹⁴C sur le cycle des molécules parents demeure intacte sur les métabolites. La distribution se fait suivant le degré de liposolubilité des composés. Pour les composés parents, le log Kow varie de 2,3 à 4,4 (cf. annexe Annexe 4) ce qui signifie qu'ils auront tendance à se distribuer préférentiellement dans les tissus riches en graisse. Les données toxicocinétiques dans les dossiers règlementaires montrent que les molécules radiomarquées (parents et métabolites) se distribuent rapidement dans tous les organes de l'organisme, que ces molécules soient liposolubles ou hydrosolubles. Par exemple, pour le bixafen, le pic de radioactivité est atteint 1 heure après l'exposition ou encore pour le boscalid, le Tmax plasmatique est d'une heure. Toutefois, les organes dans lesquels on retrouve le plus de radioactivité sont en général le foie, les reins suivis du tractus gastro-intestinal.

La quantité métabolisée peut varier suivant les composés SDHI. On peut généraliser en disant qu'ils sont très métabolisés en raison de la présence de nombreux métabolites identifiés dans les urines et les fèces. A titre d'exemple, la présence de bixafen dans les fèces, est de 4% et de 8,5% dans les urines, confirmant la formation importante de métabolites. Cette observation se retrouve dans la majorité des dossiers règlementaires. Des pourcentages plus importants de SDHI dans les fèces peuvent s'expliquer par la fraction non absorbée du composé parent à de fortes concentrations.

Plus de 80% de la radioactivité est éliminée dans les 48 à 72 heures suivant l'exposition, ce qui suggère une élimination importante et rapide de l'organisme. La radioactivité est éliminée préférentiellement dans les fèces entre 80 et 90% et entre 10 et 15% dans les urines. L'élimination pour certains SDHI est dose dépendante, mais il est impossible de distinguer si cela est dû à la saturation métabolique ou encore à une élimination limitée par une rétention tissulaire.

En conclusion, les SDHI sont rapidement absorbés, métabolisés et distribués dans tous les tissus. Ils sont aussi rapidement éliminés de l'organisme et sont donc peu accumulés dans les tissus. Le foie, les reins et le tractus gastro-intestinal sont les organes où l'on retrouve le plus de radioactivité mesurée. Ceci peut s'expliquer par l'élimination biliaire dans le tractus gastro-intestinal ou encore la non-absorption du parent et l'élimination urinaire. Pour des composés comme les SDHI ayant en général de courtes demi-vies plasmatiques, on considère la concentration maximale dans les tissus cibles comme paramètre lié à la toxicité. Finalement, on constate que la concentration des SA SDHI dans les tissus est relativement faible aux doses d'exposition utilisées.

VTR

Un état des lieux des VTR existantes pour les pesticides SDHI considérés et des VTR révisées par le GT est présenté dans le Tableau 52 : Synthèse des conclusions du GT sur les VTR des SDHI considérés sur la base des données actuelles.

Sur les 39 VTR disponibles pour les 14 substances analysées, le GT a remis en cause 11 VTR qui sont :

- les AOEL pour le benzovindiflupyr, le cyflumetofen, l'isofetamid ;
- les DJA pour la carboxine, le cyflumetofen, le fluopyram, l'isopyrazam et le penthiopyrad ;
- les ARfD pour le cyflumetofen, le penflufen et le pydiflumetofen.

Les raisons pour proposer des nouvelles valeurs portent principalement sur une remise en question du choix de l'étude clé ou de la dose critique (par exemple, une NOAEL établie dans le dossier et considérée comme une LOAEL selon le GT) mais aussi sur le choix de l'effet critique ou des incertitudes liées à la qualité de l'étude clé.

Parmi ces substances, le GT note que la carboxine et l'isopyrazam ne sont plus des substances actives approuvées dans le règlement No 1107/2009 et que la demande d'approbation du pydiflumetofen est toujours en cours d'évaluation. De plus, des signalements PE ont été soulevés pour certaines substances qui, s'ils étaient confirmés dans le cadre de la ré-évaluation de ces substances, conduiraient à leur non ré-approbation.

Tableau 52 : Synthèse des conclusions du GT sur les VTR des SDHI considérés sur la base des données actuelles

Substance	AOEL (mg/kg pc/j)	DJA (mg/kg pc/j)	ARfD (mg/kg pc/j)
Benzovindiflupyr	Proposition nouvelle valeur : 0,012 (Valeur réglementaire actuelle : 0,04) Niveau de confiance : moyen faible	Maintien de la VTR actuelle : 0,05 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,1 Niveau de confiance : moyen
Bixafen	Maintien de la VTR actuelle : 0,13 Niveau de confiance : moyen fort	Maintien de la VTR actuelle : 0,02 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,2 Niveau de confiance : moyen
Boscalid	Maintien de la VTR actuelle : 0,1 Niveau de confiance : moyen fort	Maintien de la VTR actuelle : 0,04 Niveau de confiance : moyen fort	/
Carboxin	Maintien de la VTR actuelle : 0,055 Niveau de confiance : moyen fort	Proposition nouvelle valeur : 0,0027 (Valeur réglementaire actuelle : 0,008) Niveau de confiance : moyen	/
Cyflumetofen	Proposition nouvelle valeur : 0,07 (Valeur réglementaire actuelle : 0,11) Niveau de confiance : moyen	Proposition nouvelle valeur : 0,1 (Valeur réglementaire actuelle : 0,17) Niveau de confiance : moyen	Proposition nouvelle valeur : 0,5 (Pas de valeur réglementaire actuelle) Niveau de confiance : moyen
Fluopyram	Maintien de la VTR actuelle : 0,05 Niveau de confiance : faible	Proposition nouvelle valeur : 0,004 (Valeur réglementaire actuelle : 0,012) Niveau de confiance : faible	Maintien de la VTR actuelle : 0,5 Niveau de confiance : moyen
Flutolanil	Maintien de la VTR actuelle : 0,26 Niveau de confiance : moyen fort	Maintien de la VTR actuelle : 0,09 Niveau de confiance : moyen fort	Maintien de la VTR actuelle : 0,4 Niveau de confiance : moyen
Fluxapyroxad	Maintien de la VTR actuelle : 0,04 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,02 Niveau de confiance : moyen fort	Maintien de la VTR actuelle : 0,25 Niveau de confiance : moyen
Isofetamid	Proposition nouvelle valeur : 0,03 (Valeur réglementaire actuelle : 0,05) Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,02 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 1 Niveau de confiance : moyen fort

Substance	AOEL (mg/kg pc/j)	DJA (mg/kg pc/j)	ARfD (mg/kg pc/j)
Isopyrazam	Maintien de la VTR actuelle : 0,05 Niveau de confiance : moyen	Proposition nouvelle valeur : 0,018 (Valeur réglementaire actuelle : 0,03) Niveau de confiance : moyen faible	Maintien de la VTR actuelle : 0,2 Niveau de confiance : moyen
Penflufen	Maintien de la VTR actuelle : 0,077 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,04 Niveau de confiance : moyen fort	Proposition nouvelle valeur : 0,33 (Valeur réglementaire actuelle : 0,5) Niveau de confiance : moyen faible
Penthiopyrad	Maintien de la VTR actuelle : 0,1 Niveau de confiance : moyen	Proposition nouvelle valeur : 0,03 (Valeur réglementaire actuelle : 0,1) Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,75 Niveau de confiance : moyen fort
Pydiflumetofen	Maintien de la VTR actuelle : 0,1 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,09 Niveau de confiance : moyen	Proposition nouvelle valeur : 0,1 (Valeur réglementaire actuelle : 0,3) Niveau de confiance : moyen
Sedaxane	Maintien de la VTR actuelle : 0,28 Niveau de confiance : moyen	Maintien de la VTR actuelle : 0,11 Niveau de confiance : moyen faible	Maintien de la VTR actuelle : 0,3 Niveau de confiance : moyen

7 Dysfonctionnement de la SDH, pathologies et organes cibles

Ce chapitre a pour but d'identifier des organes cibles suite à une inactivation génétique de la SDH ou une inhibition chimique par des inhibiteurs pharmacologiques non phytopharmaceutiques. Dans une première partie, sont rapportés les effets des mutations SDHx qui renseignent sur les effets et les maladies associées à une inactivation de la SDH. Ces connaissances permettent de faire des analogies entre les effets d'une inactivation par mutation de la SDH et les effets d'une inhibition chimique de la SDH.

Ce raisonnement par analogie est schématisé dans la Figure 16 : Identification des organes cibles des SDHI par analogie mais ne permet pas d'extrapoler les effets et maladies associés à une inactivation de la SDH directement aux effets induits par les SDHI, en raison de plusieurs limitations, d'une part, une inhibition transitoire de l'enzyme lors des périodes d'exposition aux SDHI, d'autre part, le caractère pléiotropique des atteintes observées lors d'une inactivation génétique de la SDH.

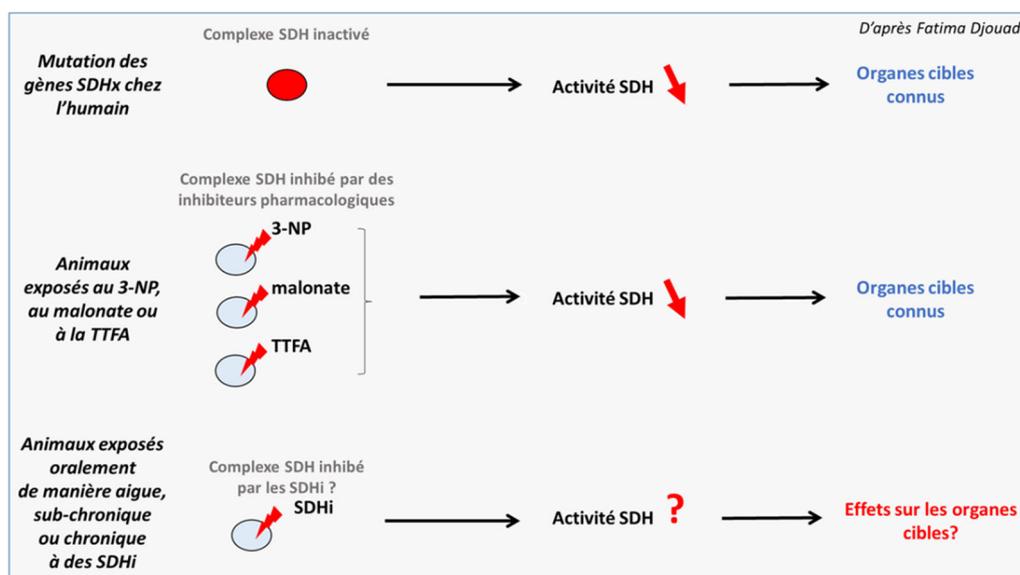


Figure 16 : Identification des organes cibles des SDHI par analogie

7.1 Mutations rares observées

Chez l'humain, des mutations affectant un gène codant pour l'une des sous-unités du complexe II peuvent aboutir à un dysfonctionnement mitochondrial et à des pathologies associées. Ces mutations, qui induisent une inactivation partielle ou totale de la SDH, conduisent à un panel de pathologies humaines dont les signes cliniques peuvent renseigner sur les organes cibles et les effets délétères potentiels d'une inhibition chimique de la SDH par les pesticides SDHI.

Des mutations ou variants pathogènes, qui affectent les gènes *SDHx* et provoquent une inhibition du complexe II, peuvent donner soit :

- un déficit primaire en complexe II, c'est-à-dire un déficit héréditaire avec des mutations germinales transmises à la descendance. Il s'agit de maladies rares appartenant à la grande famille des maladies mitochondriales ;
- une susceptibilité à certains cancers qui se développent lorsque une mutation héréditaire hétérozygote dans un des gènes *SDHx* est associée à une mutation ou délétion du second allèle somatique.

7.1.1 Déficiences héréditaires isolées en complexe II chez l'être humain

Les déficiences héréditaires isolées en complexe II appartiennent au groupe des maladies mitochondriales (prévalence chez les personnes âgées de moins de 16 ans : 1/5000). Ces maladies sont cliniquement hétérogènes et peuvent se déclarer à n'importe quel âge. Elles peuvent se manifester avec une grande étendue de symptômes, dans n'importe quel organe ou tissu, la plupart du temps avec des défaillances multiples (Dard L. et al, 2020). Même si les maladies mitochondriales touchent principalement les tissus fortement consommateurs d'énergie comme les muscles, dont le cœur et le système nerveux central, il existe des atteintes multi-tissulaires et des pathologies d'organes encore inexplicables.

En ce qui concerne l'OXPPOS, les mutations nucléaires ou mitochondriales touchent des gènes qui codent soit pour des protéines impliquées dans la structure des différents complexes (complexes I à V), soit leur assemblage, ou encore des protéines participant au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Contrairement aux autres complexes de la phosphorylation oxydative, le complexe II est le seul dont les 4 sous-unités sont codées uniquement par le génome nucléaire. Les complexes I, III, IV et V incluent quant à eux des sous-unités codées par le génome mitochondrial. On retrouve souvent une diminution de l'activité enzymatique du complexe II associée à une diminution des activités enzymatiques d'autres complexes de la chaîne respiratoire, comme dans les déficiences du complexe I par exemple, mais seuls les déficiences isolées du complexe II sont examinés dans ce chapitre.

Les déficiences mitochondriales isolées en complexe II sont donc des maladies rares qui représentent approximativement 2% des maladies mitochondriales diagnostiquées. La revue la plus récente recense 61 patients atteints et 32 variants génétiques différents sur les gènes *SDHx* (Fullerton et al. 2020). Les mutations se transmettent principalement selon un mode autosomique récessif, c'est-à-dire qu'il faut que les deux allèles soient mutés pour que la maladie se manifeste. Seul un variant particulier sur le gène *SDHA* (c.1351C>T p.(Arg451Cys)) a été rapporté avec un mode autosomique dominant.

La vaste majorité des patients développe des symptômes durant l'enfance et présente un syndrome de Leigh, qui est une encéphalopathie sévère caractérisée par des lésions neurologiques avec une atteinte des noyaux gris centraux (ou ganglions de la base) et du tronc cérébral (Fullerton et al. 2020). Même si la plupart des patients porte des mutations sur le gène *SDHA*, des variants pathogènes ont aussi été rapportés sur les gènes *SDHB*, *SDHD* et *SDHAF1*²⁶ (Tableau 53).

La mesure de l'activité enzymatique de la SDH participe, entre autres, au diagnostic des déficiences isolées. Cette mesure est réalisée soit sur des homogénats ou des préparations de mitochondries isolées à partir de biopsies des organes atteints, soit sur des coupes de tissus

²⁶ Le gène *SDHAF1* code l'une des 4 protéines d'assemblage (SDH assembly factor 1-4 : *SDHAF1-4*) indispensable à la stabilisation des sous-unités et à l'incorporation des groupements prosthétiques.

par histochimie enzymatique. La révélation histochimique de l'activité SDH est informative et très utilisée en particulier quand le muscle est atteint.

On peut penser qu'une inactivation complète de la SDH n'est pas compatible avec la vie, car aucun patient avec une activité enzymatique nulle n'a été rapporté. Il est intéressant de noter que les modèles de souris knock-out homozygotes pour la SDH sont létaux (Lussey-Lepoutre et al. 2018).

En résumé, les gènes SDHx mutés, les organes/tissus atteints ainsi que les principaux signes cliniques sont présentés ci-dessous.

Tableau 53: Organes cibles et signes cliniques des déficits héréditaires isolés en complexe II (Fullerton et al. 2020)

Gène	Nombre de cas	Organes/tissus	Signes cliniques
SDHA	32	<ul style="list-style-type: none"> - Système nerveux central - Yeux - Cœur - Muscle - Poumon 	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome de Leigh/ataxie - Retard de développement ou régression - Atrophie optique/nystagmus - Cardiomyopathie - Dystonie/hypotonie/crampes - Détresse respiratoire - Autres : hépato-splénomégalie/difficulté d'alimentation
SDHB	11	<ul style="list-style-type: none"> - Système nerveux central - Yeux - Cœur - Muscle - Poumon 	<ul style="list-style-type: none"> - Ataxie/troubles coordination/spasticité - Retard/régression du développement/retard des fonctions cognitives - Atrophie optique/strabisme (27%) - Cardiomyopathie (18%) - Dystonie/hypotonie/problèmes musculaires ou des membres - Détresse respiratoire (18%)
SDHD	2	<ul style="list-style-type: none"> - Système nerveux central - Yeux - Cœur - Muscle 	<ul style="list-style-type: none"> - Ataxie - Retard/régression du développement - Nystagmus - Cardiomyopathie (50%) - Dystonie/hypotonie - Autres : Microcéphalie
SDHAF1	16	<ul style="list-style-type: none"> - Système nerveux central - Muscle 	<ul style="list-style-type: none"> - Ataxie/Tétraparésie/Spasticité - Retard/Régression du développement - Dystonie - Autres: Leucoencéphalopathie/Retard de croissance

7.1.2 Régulation de l'expression de la SDH

Les déficits en SDH ne sont pas uniquement liés à des mutations dans les gènes SDHx. Ils peuvent également être le fait d'une régulation négative de l'expression des gènes SDHx, *via* la méthylation de leur promoteur. Ainsi, chez certains sujets porteurs de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) ne présentant aucune mutation dans les gènes SDHx, une hyperméthylation des îlots CpG sur le promoteur du gène SDHC est observée dans les tumeurs (Lussey-Lepoutre et al. 2017; MacFarlane et al. 2020). Cette hyperméthylation entraîne une diminution de l'expression de la sous-unité SDHC, avec pour conséquence, un désassemblage complet du complexe SDH et une absence d'activité enzymatique. Une diminution de l'expression d'ARNm de gènes SDHx non mutés peut également être observée, en lien avec des mutations non-sens survenant pendant l'édition du messager ou encore avec l'expression de microARN (miR) ciblant les ARNm SDHx (Bora E. Baysal et al. 2013; Eichner et al. 2010; Lee et al. 2016; Tsang et al. 2014). Par exemple, le microARN-210 est surexprimé dans les stades tardifs du cancer du poumon non à petites cellules. Des travaux réalisés *in vitro* dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 montrent que le miR-210 cible l'ARNm SDHD, ce qui s'accompagne d'une activation de HIF1 en accord avec des effets bien décrits des mutations « perte de fonction » des gènes SDHx, et d'une augmentation de la production de lactate (Puisségur et al. 2011). Les travaux de Lee *et al.* dans des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) montrent que l'ARNm de SDHA est une cible pour le miR-31. La diminution de l'expression de la SDHA entraîne alors une altération de la respiration au profit de la production de lactate, une augmentation de la production de ROS et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Lee et al. 2016). Dans des cellules cancéreuses mammaires humaines, le miR-378 cible l'ARNm de SDHB favorisant la prolifération cellulaire et un changement métabolique favorisant la glycolyse aux dépens de la respiration cellulaire (Eichner et al. 2010). De plus, en utilisant des algorithmes de prédiction de cible, Kelly *et al.* ont montré que les miR-127, -154, -433, -485-3p, et -539 peuvent cibler des gènes connus pour être impliqués dans la pathogenèse des GIST, incluant les gènes SDHx (Kelly et al. 2013).

7.1.3 Diminution de l'expression de la SDH et cancers

L'analyse de données récentes de transcriptome à haut débit obtenues à partir de cohortes de patients atteints de différents cancers montre une relation entre une diminution de l'expression de la SDH dans les tumeurs et la survie des patients.

En effet, en 2018, Tseng *et al.* ont montré que l'expression de la protéine SDHB, analysée par immunohistochimie (n = 96), était souvent diminuée dans les tumeurs hépatiques, par rapport au tissu sain adjacent. Ils ont également établi que cette expression diminuée de SDHB était associée à un stade tumoral avancé et à une survie générale des patients significativement plus faible (Tseng et al. 2018). Ces résultats ont été complétés et confirmés, en 2019, par la mise en évidence d'une diminution de l'expression des ARNm et des protéines des 4 sous-unités de la SDH dans les tumeurs hépatiques (n = 30) par rapport au tissu péri-tumoral, les patients avec une expression faible de la SDH ayant un moins bon pronostic vital, dans une cohorte de 244 patients (J. Li et al. 2019).

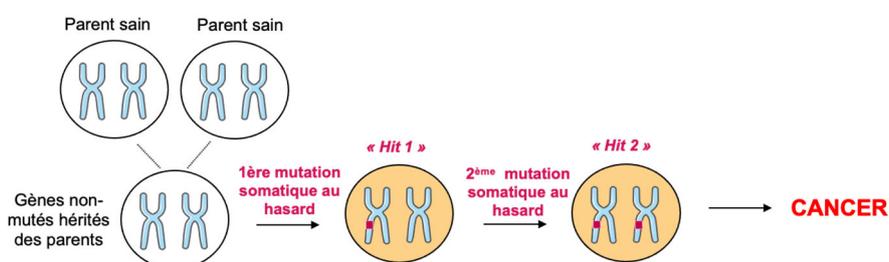
Une analyse de la base de données « TCGA-KIRC » correspondant à 573 patients atteints de carcinome rénal à cellules claires (ccRCC) a montré que les SDHB, SDHC et SDHD avaient des niveaux d'expression génique réduits dans les tumeurs ccRCC comparées au tissu rénal normal, et que la survie générale des patients était nettement moins favorable lorsque l'expression de ces sous-unités était diminuée (Aggarwal et al. 2021). Ces résultats ont été corroborés en 2022 par Jing Yang et al., qui ont montré que, comme les 3 autres sous-unités, l'expression de la SDHA était également plus faible dans les tumeurs des patients. De façon intéressante, ces auteurs ont étendu leur recherche bio-informatique à 32 autres types de

cancers incluant 10897 échantillons de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas). Cette analyse a révélé que l'expression des gènes d'au moins 2 sous unités de la SDH, pas toujours les mêmes, était diminuée dans les tumeurs par rapport au tissu sain dans les cancers du côlon (COAD [adénocarcinomes]), du rein (KICH [carcinome à cellules chromophobes], KIRC [carcinome rénal à cellules claires], KIRP [carcinome papillaire]), du foie (LIHC [carcinome hépatocellulaire]), du rectum (READ [adénocarcinome]), dans les mélanomes (SKCM [mélanomes cutanés]) et dans les cancers de la thyroïde (J. Yang et al. 2022). Ces données s'avèrent particulièrement pertinentes au regard des organes cibles de toxicité des SDHI comme il sera vu dans la suite du document.

7.1.4 Mutations de la SDH chez l'être humain et susceptibilité à certains cancers

Au début des années 2000, les premières mutations de gènes de la SDH responsables de formes familiales de cancers ont été identifiées (B. E. Baysal et al. 2000; Astuti et al. 2001). Par la suite, on a pu décrypter les bases génétiques du déficit en SDH associé à certains cancers et montrer que les gènes SDHx étaient des **gènes suppresseurs de tumeurs** qui suivent le modèle que l'on appelle l'hypothèse des « *two hits* » de Knudson. Dans ce modèle, pour les cancers héréditaires, les patients ont généralement hérité de leurs parents une 1^{ère} mutation germinale à l'état hétérozygote dans l'un des gènes SDHx puis le processus tumoral a été initié par une 2^{ème} mutation somatique qui survient de façon aléatoire, aboutissant à une perte d'hétérozygotie. Ces deux événements conduisent à une inactivation complète de la SDH dans une cellule (Figure 17 : Théorie des deux « hits » de Knudson Figure 17). Ce modèle pose la question de la sensibilité particulière aux SDHI des sujets portant une mutation à l'état hétérozygote, dont seul un allèle SDHx fonctionne (cf. section 7.1.5).

Cancer non-héréditaire (assez commun)



Cancer héréditaire (rare)

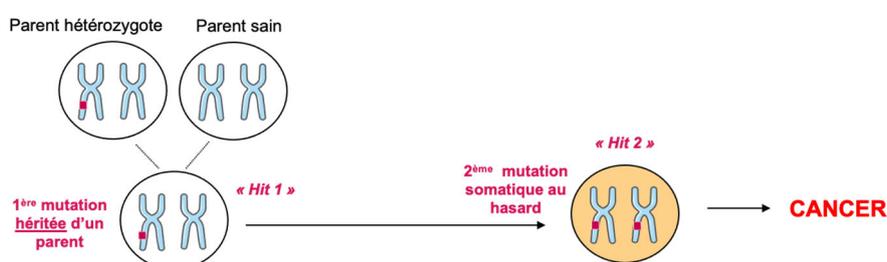


Figure 17 : Théorie des deux « hits » de Knudson

Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'expansion clonale de la cellule déficiente en SDH en tumeur (accumulation de succinate, ROS, ...) sont détaillés dans le paragraphe 7.1.6.

Des mutations touchant les gènes SDHx et les gènes codant les facteurs d'assemblage SDHAF2 et SDHAF3 ont été identifiées et reconnues responsables d'une susceptibilité accrue à différents cancers rares (Favier, Amar, et Gimenez-Roqueplo 2015; Bayley et al. 2010; Dwight et al. 2017) tels que les :

- paragangliomes (PGL)²⁷ et phéochromocytomes (PCC),
- tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST),
- carcinomes rénaux (RCC),
- adénomes hypophysaires (AH).

Tableau 54: Fréquence des mutations sur les différents gènes codant la SDH (MacFarlane et al. 2020)

Gène SDHx	PCC	PGL tête/cou	PGL thoracique	PGL abdominal	GIST	RCC	AH
SDHA	+	+	+	+	+++	+	+
SDHB	+	++	++	+++	++	+++	+
SDHC	+	++	+	++	++	+	+
SDHD	++	+++	+	+	+	+	+
SDHAF2	+	+++	+	+			

Les PGL et PCC sont les tumeurs les plus communes chez les patients porteurs de mutations germinales des gènes SDHx, et les mutations dans l'un des gènes SDHx rendent compte de 30 à 40% des cas héréditaires de PGL et PCC (MacFarlane et al. 2020; Buffet et al. 2020). Les mutations germinales prédisposant aux PGL et PCC sont transmises selon un mode autosomique dominant pour les gènes SDHA, SDHB et SDHC et selon un mode autosomique dominant avec empreinte maternelle pour les gènes SDHD et SDHAF2.

La plupart des PCC et des PGL sont des tumeurs bénignes, mais 40% des PGL et 10% des PCC présentent un phénotype agressif, avec des métastases et une diminution importante de la survie à cinq ans (50%) (Lussey-Lepoutre et al. 2017). Un risque plus élevé de métastases a été rapporté chez les patients porteurs d'une mutation de la SDHB (Gimenez-Roqueplo et al. 2003). On peut néanmoins souligner que des formes malignes de PGL/PCC ont été associées à des mutations sur tous les gènes SDHx (MacFarlane et al. 2020).

²⁷ Les PGL sont des tumeurs neuroendocrines rares qui se développent à partir des ganglions qui constituent le système nerveux autonome sympathique (au niveau du thorax, de l'abdomen, ou du pelvis) et parasympathique (au niveau de la tête et du cou). Les PCC sont des tumeurs qui se développent aux dépens des cellules chromaffines de la médullo-surrénale (Lussey-Lepoutre et al. 2017; Buffet et al. 2020).

Les mutations du gène SDHB sont plus souvent associées avec les PGL abdominaux, thoraciques et de la tête et du cou, avec un risque plus faible de développer des PCC, comparé aux mutations de la SDHD (Tableau 54). Le gène SDHD, est quant à lui, le gène le plus fréquemment muté dans les PGL de la tête et du cou mais avec un risque de métastases plus faible que lorsque le gène SDHB est muté. Ainsi, plus de 60% des patients présentant des PGL et des PCC ont des mutations sur les gènes SDHB et SDHD et beaucoup plus rarement sur les gènes SDHC et SDHA. Des mutations sur le gène d'assemblage SDHAF2 ont été rapportées chez de rares patients atteints de PGL de la tête et du cou (Lussey-Lepoutre et al. 2017; Buffet et al. 2020).

Chez l'être humain, d'autres types de tumeurs sont associées à des mutations de la SDH, telles que les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Les mutations de la SDH sont rares dans le groupe des GIST puisqu'elles représentent moins de 10% des gènes mutés. La plupart des GIST liés à un déficit en SDH sont associés à des mutations germinales de la SDHA (47%) (Tableau 54).

Des mutations germinales sur les gènes SDHx sont également impliquées dans des cancers des cellules rénales (RCC). Les mutations trouvées rendent compte de 0,05% à 0,2% des cancers du rein avec une prédominance de mutations sur le gène SDHB (Tableau 54). Les carcinomes rénaux liés à un déficit de la SDH ont une morphologie particulière, avec des tumeurs irrégulières rouges/marrons ayant un aspect solide et sont composés de cellules éosinophiles avec des inclusions cytoplasmiques claires ou vacuolisées (R. Kumar et al. 2018).

Enfin, des mutations de la SDH ont été associées à quelques rares cas d'adénomes hypophysaires, de cancers de la thyroïde, de neuroblastomes, de tumeurs neuroendocrines du pancréas, et de lymphomes (MacFarlane et al. 2020).

Compte tenu de la complexité génétique des PGL et des PCC, mais aussi des autres types de tumeurs (GIST, RCC...), et de l'existence de nombreux variants des gènes SDHx dont on ne peut pas prédire les conséquences, des analyses immunohistochimiques (IHC) de la SDHA et SDHB en particulier, ont été développées ces dernières années pour affiner et compléter les analyses génétiques. Il a pu ainsi être montré que l'inactivation bi-allélique de n'importe quel gène de la SDH déstabilise le complexe enzymatique et aboutit toujours à la dégradation protéolytique de la protéine d'ancrage SDHB qui est visualisé avec un marquage IHC négatif de la SDHB (van Nederveen et al. 2009). En revanche, le marquage IHC de la SDHA est négatif uniquement lorsque le gène SDHA est muté, mais positif lorsque les autres gènes sont mutés. Les marquages IHC de la SDHB, reconnus fiables et reproductibles, sont utilisés en clinique, en particulier pour le diagnostic des PGL, GIST et RCC (MacFarlane et al. 2020). Au final, dans le cadre du cancer, tous les gènes codant pour les sous-unités de la SDH (*SDHx*) sont considérés comme suppresseurs de tumeurs, et l'inactivation somatique de la SDH constitue un mécanisme cellulaire reconnu intervenant dans la susceptibilité à certains cancers rares chez l'être humain.

7.1.5 Hypothèse d'une sensibilité particulière aux SDHI des sujets portant une mutation à l'état hétérozygote

Des mutations affectant l'un des gènes codant pour une des sous-unités de la SDH peuvent donner :

- soit un déficit héréditaire, très rare, lié à des mutations germinales transmises à la descendance (section 7.1.1),
- soit des cancers dans lesquels 2 événements doivent survenir (section 7.1.4) pour déclencher le processus tumoral.

Les mutations ont pour conséquence de déstabiliser les protéines ce qui conduit, en général, à une diminution de l'activité enzymatique de la SDH, variable d'un individu à l'autre. La relation entre le degré d'inactivation de l'enzyme et le degré d'inhibition de la respiration mitochondriale n'est pas connue.

Dans le cas des mutations de la SDH prédisposant à développer certains cancers, les individus hétérozygotes, qui ont une protéine SDH altérée mais sans aucun phénotype, pourraient constituer une population sensible aux SDHI. Selon cette hypothèse, les individus hétérozygotes possèdent à la fois une forme mutée du complexe enzymatique SDH et une forme normale, avec pour conséquence une activité SDH diminuée. Chez ces sujets, l'altération de l'activité SDH résiduelle pourrait être accentuée par une inhibition par les SDHI, et conduire, comme chez les individus porteurs d'une mutation à l'état homozygote, à une accumulation de succinate, événement majeur dans l'établissement du phénotype tumoral. Cette hypothèse est schématisée dans la Figure 18.

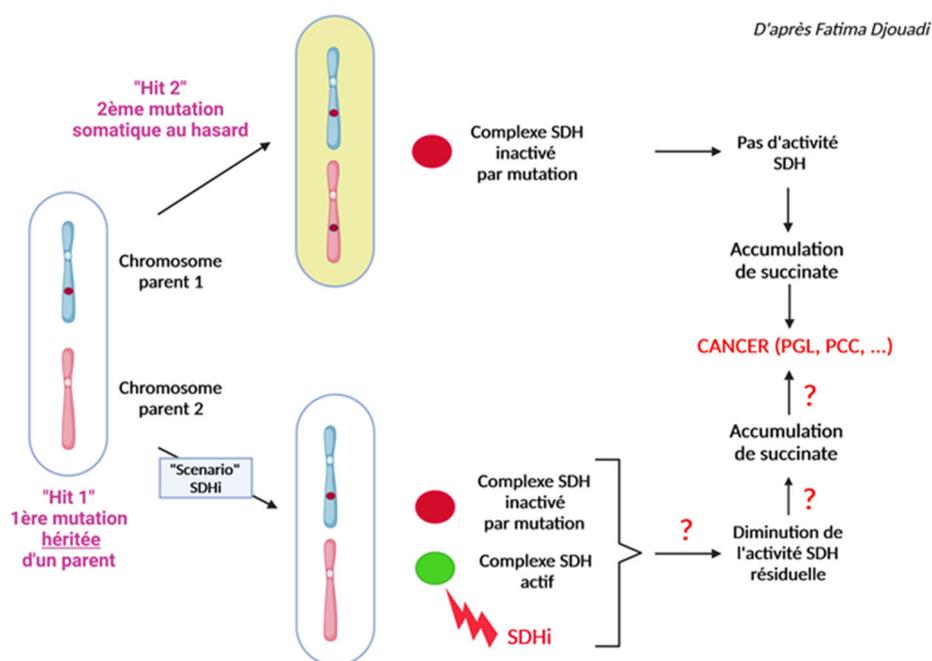


Figure 18: Schématisation de l'hypothèse d'une sensibilité aux SDHI pour des individus porteurs de mutations à l'état hétérozygote à développer des cancers.

Cette hypothèse pourrait également s'appliquer à d'autres mitochondriopathies, notamment celles affectant l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. Dans ce cas, chez des sujets présentant une activité altérée de la respiration mitochondriale, la diminution de l'activité du complexe II pourrait aggraver le phénotype.

7.1.6 Effets moléculaires et cellulaires d'une inactivation génétique de la SDH

Les mécanismes cellulaires et moléculaires consécutifs à une inactivation génétique d'un des gènes SDHx ont été particulièrement étudiés dans le contexte des PGL/PCC liés à une perte

d'hétérozygotie sur l'un des gènes SDHx et dans des modèles cellulaires dans lesquels cette inactivation génétique a été reproduite. La principale conséquence de l'inactivation de la SDH est le blocage du cycle de Krebs entraînant l'accumulation du substrat de la SDH, le succinate (Pollard et al. 2005). Le profilage métabolique des PGL mutés sur les gènes SDHx montre que les concentrations de succinate y sont jusqu'à 100 fois supérieures à celles des tumeurs sans mutations SDHx tandis qu'on y observe des niveaux très faibles de fumarate. Cet événement est considéré comme un élément fondateur des processus oncogéniques liés à la SDH.

7.1.6.1 Pseudo-hypoxie liée à une inhibition de la SDH

Comme indiqué précédemment, une première conséquence qui découle d'une inactivation de la SDH est une augmentation du niveau de succinate qui peut être interprétée comme un signal d'hypoxie car le succinate est un inhibiteur des prolyl-hydroxylases, des dioxygénases responsables de l'hydroxylation des facteurs de transcription de la famille HIF (Hypoxia Inducible Factor).

La famille des facteurs de transcription hétérotrimériques HIF, formée de trois sous-unités α (HIF1 α , HIF2 α et HIF3 α) et d'une sous-unité β (HIF1 β), est aussi appelée ARNT (pour aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Les deux facteurs de transcription actifs (HIF1 α et HIF2 α) sont régulés par l'action de trois prolyl 4-hydrogénases dépendantes de l'oxygène (PHD1-3). En situation de normoxie, les PHD hydroxylent les sous-unités HIF α sur des résidus prolyl spécifiques, formant ainsi un site de reconnaissance pour un complexe de E3 ligase contenant le facteur von Hippel-Lindau (pVHL), lequel se lie et induit la polyubiquitylation impliquée dans l'adressage de HIF α vers le protéasome et sa dégradation. En condition d'hypoxie, les PHD sont inactives et HIF α est stabilisé et l'hétérodimère HIF α /HIF β active l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation métabolique à l'absence d'oxygène, qui inclut notamment des gènes codant des enzymes de la glycolyse. Cette activation de la glycolyse aux dépens des phosphorylations oxydatives est connue sous le nom d'effet Warburg, une reprogrammation métabolique connue pour être un "hallmark" du cancer. Ainsi, l'accumulation anormale de succinate dans les tumeurs liées à une mutation à l'état homozygote des gènes SDHx induit un phénotype de pseudo-hypoxie, *via* l'inhibition de l'activité PHD (Selak et al. 2005; Letouzé et al. 2013). Ce phénotype de pseudohypoxie est impliqué dans un remodelage métabolique et transcriptomique qui favorise l'angiogenèse, le développement de métastases et la chimiorésistance (Kluckova et Tennant 2018). Le modèle de l'induction d'un état pseudo-hypoxique lié à un dysfonctionnement de la SDH est renforcé par l'association d'un effet pathologique semblable à celui dépendant de la SDH avec une mutation gain de fonction de *HIF2A* (*EPAS1*) (Zhuang et al. 2012).

7.1.6.2 Dérégulation des marques épigénétiques liés à une inhibition de la SDH

Le succinate est un inhibiteur de plusieurs dioxygénases dépendantes de l' α -cétoglutarate, telles que les déméthylases d'histone contenant le domaine Jumonji (JMHD-déméthylases) et les déméthylases de l'ADN de la famille Translocation Ten-eleven (TET-déméthylases) ou de déméthylases des histones (KDM, histone lysine demethylase). Ainsi, une augmentation de la concentration de succinate liée à l'inactivation de la SDH peut entraîner un remodelage profond du profil épigénétique (Moog et Favier 2022).

La méthylation de l'ADN est une modification chimique des cytosines dans les îlots CpG des promoteurs sans altération de l'appariement des bases et qui permet de réguler la transcription en réponse à divers signaux hormonaux, nutritionnels ou environnementaux. La méthylation de l'ADN est associée à une répression transcriptionnelle. Chez les patients présentant des

tumeurs PCC et PGL associées à des mutations dans un des gènes codant une sous-unité de la SDH, une hyperméthylation de l'ADN au niveau du génome entier a été observée, affectant les promoteurs de plus de 4000 gènes. Cette hyperméthylation de l'ADN a été reproduite dans des cellules chromaffines de souris dans lesquelles le gène *SDHB* a été inactivé (Morin et al. 2020; Letouzé et al. 2013). Parmi les gènes réprimés, on trouve des gènes impliqués dans la synthèse des catécholamines comme *PNMT* (*phényléthanolamine N-méthyltransférase*), des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *RBP1* (*retinol-binding protein 1*), des gènes participant à la réparation de l'ADN notamment *MGMT* (*O(6)-méthylguanine-DNA-méthyltransférase*), ou des gènes associés à la transition neuroendocrino-mésenchymateuse, tels que *KRT19* (*kératine 19*) (Letouzé et al. 2013; Lorient et al. 2015).

La méthylation des histones est une modification post-traductionnelle qui affecte les résidus lysine et arginine, principalement à l'extrémité N-terminale de la séquence protéique. Les résidus peuvent être mono-, di-, ou triméthylés, modulant ainsi le degré de compaction de la chromatine et par conséquent, l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle. Dans les tumeurs liées à une mutation à l'état homozygote dans un des gènes codant la SDH, une augmentation de la méthylation de H3K9 triméthylés a été observée (Letouzé et al. 2013). Cette hyperméthylation des histones est retrouvée dans différents modèles cellulaires dans lesquelles les gènes codant *SDHA* ou *SDHB* ont été inactivés par ARN interférence (M. Xiao et al. 2012; Letouzé et al. 2013; Aspuria et al. 2014) et dans des cellules exposées à l'inhibiteur pharmacologique de la SDH, le TTFA (Cervera et al. 2009).

7.1.6.3 Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle essentiel dans la régulation de voies de signalisation et métaboliques. La production continue de ROS à bas bruit contribue notamment à maintenir le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Les enzymes antioxydantes contrôlent étroitement la production de ROS afin de protéger les cellules des dommages oxydatifs et d'autres processus pathologiques, incluant la tumorigenèse.

Bien que la plupart des ROS mitochondriaux soient produits par les complexes I et III de la chaîne respiratoire des mitochondries, le complexe II peut également en produire, de manière directe ou indirecte (Guzy et al. 2008; Brand 2016). L'étude de la production indirecte de ROS par le complexe II est plus largement décrite. Elle repose sur l'observation ancienne que les mitochondries isolées produisent de grandes quantités de ROS en présence de concentrations élevées (≥ 5 mM) de succinate, le substrat du complexe II (Boveris, Cadenas, et Stoppani 1976). La première preuve de l'existence d'un lien entre la production de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et l'activité du complexe II a été établie *in vitro*, dans des préparations de mitochondries dérivées de cœur de bœuf, en utilisant le TTFA et le malonate, deux inhibiteurs du complexe II (Ksenzenko et al. 1984). Cette observation a également été faite en présence de l'atpénine A5, un inhibiteur du site Quinone (site Q) de la SDH, ou lorsqu'un autre blocage en aval de la chaîne respiratoire se produit (Siebels et Dröse 2013). La diminution de consommation d'oxygène associée à la production de ROS est décrite dans les lignées cellulaires d'hépatocarcinomes humains HepG2 et de fibroblastes humains BJ exposées au bixafen et au boscalid. Dans les cellules BJ, les ROS mitochondriaux sont augmentés en réponse au bixafen mais pas au boscalid (d'Hose et al. 2021). Une production de ROS est observée lors d'un syndrome d'ischémie reperfusion lors des accidents cardio-vasculaires. L'accumulation de succinate représente la signature de l'ischémie *in vivo* ainsi que le facteur responsable d'une production de ROS (Chouchani et al. 2014). Des études fonctionnelles dans des organismes unicellulaires ou pluricellulaires complexes ont également montré qu'une production accrue de ROS se produit suite à l'inactivation de SDH induite par une délétion ou des mutations ponctuelles dans les orthologues des gènes humains *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* ou *SDHD* (E. H. Smith, Janknecht, et Maher 2007; Szeto et al. 2007; Goffrini et al. 2009; Ishii et al. 1998; Senoo-Matsuda et al.

2001; Guzy et al. 2008; Goncalves et al. 2021; J. Li et al. 2019; Paranagama et Kita 2018). Le mécanisme de production de ROS de manière indirecte se produit lorsque la quantité de succinate est excessive. Le flux d'électrons dérivés de la réduction du pool d'ubiquinone par le succinate augmente et produit un engorgement lors de leur transfert vers le complexe III, qui les force à retourner vers le complexe I, où de grandes quantités de ROS sont alors formées (Hagerty et al. 2021). La production directe de ROS par le complexe II est restée longtemps méconnue. Par exemple, lorsque les complexes I et III sont bloqués et que la concentration de succinate est basse ($\pm 100 \mu\text{M}$), des ROS sont produits (Quinlan et al. 2012). En présence de l'inhibiteur du site Q (TTFA), d'une concentration élevée de succinate (5 mM) et de roténone, le complexe I ne contribue pas seul à la production de ROS en comparant les facteurs d'inhibition avec le mélange glutamate + malate + rotenone (Moreno-Sánchez et al. 2013). Le site primaire de production de ROS dans le complexe II, est le FAD au sein de la sous-unité SDHA. Il ne génère pas de ROS lorsque la concentration de succinate est élevée ($\geq 5 \text{ mM}$). Le mécanisme de l'inhibition de la production de ROS par le succinate au niveau du FAD n'est pas entièrement clair, mais il a été suggéré que le succinate pouvait bloquer l'accès de l'oxygène au FAD (Hagerty et al. 2021). Les mesures de l'activité de respiration des mitochondries sont classiquement effectuées à des concentrations de succinate de l'ordre de 5 à 10 mM, ce qui pourrait masquer la contribution du FAD à la production de ROS. À 0,5 mM de succinate, concentration similaire aux niveaux physiologiques de succinate intracellulaire, la contribution du FAD à la production de ROS peut être substantielle lorsque le transport d'électrons à travers le complexe II est bloqué au niveau du site Q ou plus en aval (au niveau du complexe III par exemple), ce qui suggère que des ROS sont produits lorsque le FAD est réduit, mais que le site actif n'est pas occupé. Dans des conditions spécifiques, la génération de ROS a également été observée au niveau du site Q. Cependant, ceci est probablement peu fréquent dans le complexe II des mammifères (Hagerty et al. 2021).

7.1.6.4 Déséquilibre de la balance fer-cuivre

Dans les cellules chromaffines de souris invalidées pour le gène SDHD, on observe une transition neuroendocrino-mésenchymateuse, ainsi qu'une hyperméthylation de l'ADN et un statut pseudo-hypoxique beaucoup moins marqué que lorsque les mêmes cellules sont invalidées dans le gène SDHB, alors que l'accumulation de succinate se produit dans les 2 types de cellules de manière similaire. Ces observations indiquent que dans les cellules SDHB^{-/-}, l'inhibition des dioxygénases responsables de la déméthylation de l'ADN et de la stabilisation des facteurs HIF est plus importante que dans les cellules SDHD^{-/-}. Dans le cas de la perte de SDHB, une sous-unité qui possède des centres fer-soufre, il est observé une dérégulation de l'homéostasie du cuivre et du fer, une augmentation du cuivre mitochondrial et une augmentation du Fe^{2+} cytosolique, associées à une élévation de la production de ROS mitochondriaux qui participe à augmenter le niveau d'inhibition des dioxygénases (Goncalves et al. 2021). Ces observations suggèrent que dans les tumeurs porteuses d'une mutation sur le gène SDHB, la concomitance de niveaux de succinate et de ROS élevés conduit à un blocage plus stringent de l'activité des dioxygénases et à une agressivité tumorale plus marquée (Goncalves et al. 2021).

7.1.6.5 Reprogrammation métabolique

A côté de l'augmentation du niveau de succinate et de la diminution du niveau de fumarate, d'autres métabolites du cycle de Krebs sont également significativement impactés dans les PGL porteurs de mutations dans les gènes SDHx, incluant une diminution de l'isocitrate, du cis-aconitate (Richter et al. 2014), de l'aspartate et du glutamate (Imperiale et al. 2015). La perte de l'activité enzymatique de la SDH causée par les mutations dans les gènes SDHx entraîne un switch métabolique caractérisé par une diminution de la respiration cellulaire et une augmentation de la glycolyse, activée notamment par la mise en place du phénotype de

pseudohypoxie (Tseng et al. 2018). Toutefois, le phénotype métabolique peut différer d'un modèle cellulaire à l'autre. En effet, alors que la respiration et l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries sont plus faibles dans les cellules déficientes en SDH par rapport aux cellules non déficientes dans le cas des fibroblastes de surrénales (Křučková et al. 2020) et des cellules épithéliales rénales (Cardaci et al. 2015; Lorendeau et al. 2017) et mammaires (Bezawork-Geleta et al. 2017), ce n'est pas le cas dans un modèle dérivé des cellules chromaffines. Ce modèle conserve la fonction du complexe I et une activité respiratoire comparable à celle des cellules non déficientes avec une capacité intacte à oxyder le NADH au sein de la chaîne de transport des électrons (Křučková et al. 2020)). L'inactivation génétique de la SDH induit l'interruption du cycle de Krebs. Dans ce contexte métaboliquement altéré, un remodelage du métabolisme des cellules déficientes en SDH se met en place pour soutenir la prolifération cellulaire, avec une consommation du pyruvate extracellulaire, une activation de la pyruvate carboxylase qui convertit le pyruvate en oxaloacétate pour se réapprovisionner en aspartate, un précurseur essentiel pour la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques (Lussey-Lepoutre et al. 2015).

7.1.6.6 Promotion de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT en anglais) permet aux cellules épithéliales cancéreuses d'adopter les caractéristiques mésenchymateuses nécessaires à l'acquisition de capacités de motilité et d'invasion accrues pour la dissémination des cellules tumorales et la propagation métastatique. Dans des biopsies de PCC et de PGL, la présence de la mutation du gène SDHB est corrélée à l'augmentation de l'expression de marqueurs de l'EMT tels que LOXL2, TWIST1, TCF3 et certaines métalloprotéases, et la diminution de l'expression de KRT19 et CDH2 (Loriot et al. 2012). Les auteurs suggèrent que ce profil transcriptionnel pourrait participer à l'acquisition des propriétés métastatiques particulières du PCC et du PGL. En accord avec cette hypothèse, l'inactivation (« knockdown ») du gène SDHB favorise la prolifération, l'invasion et la migration dans plusieurs lignées de cellules tumorales dérivées de PGL et de PCC (Letouzé et al. 2013; Rapizzi et al. 2014), d'adénocarcinome ovarien (L. Chen et al. 2014) et de carcinome hépatocellulaire (Tseng et al. 2018), dans des sphéroïdes de phéochromocytome (D'Antongiovanni et al. 2017), et dans des modèles de xénotransplante de souris (Tseng et al. 2018). Dans les tumeurs mammaires humaines, l'expression de marqueurs de l'EMT est associée avec une réduction de l'expression de SDHC (Røsland et al. 2019). De même dans la lignée MCF7, l'atténuation de l'expression de SDHC par CRISPRcas9 ou l'inhibition de l'activité SDH par le malonate entraînent des modifications morphologiques typiques de marqueurs de l'EMT (diminution de l'E-cadhérine, augmentation de la vimentine et des facteurs de transcription Snail et Twist) (Røsland et al. 2019).

D'autres travaux montrent que le succinate extracellulaire est capable d'induire la migration ces cellules hépatiques stellaires (Park 2018) et des cellules souches mésenchymateuses (Ko et al. 2017). Ce mécanisme implique l'activation du récepteur au succinate SUCNR1, qui déclenche la phosphorylation de PKC et l'activation de la voie de signalisation mésenchymateuses (Ko et al. 2017).

7.1.7 Mutations de la SDH dans des modèles expérimentaux eucaryotes

La présence de PGL et de PCC est également rapportée chez le chien, ces tumeurs représentant respectivement 0,01–0,1% et 0,2% de toutes les tumeurs trouvées dans cette espèce (Galac et Korpershoek 2017). Dans près de 20% des PGL et des PCC diagnostiqués chez le chien, des métastases ont été mises en évidence dans les ganglions lymphatiques, le foie, la rate, le pancréas, les poumons, le cœur, les os et le rein (Galac et Korpershoek 2017). Dans une série de huit cas (six PCC et deux PGL carotidiens), des mutations des gènes SDHB ou SDHD ont été trouvées dans 50% d'entre eux (Holt et al. 2014). Ces mutations

comprenaient une mutation germinale SDHB (Arg38Gln) et trois mutations SDHD (Lys122Arg, deux mutations germinales et une mutation somatique).

D'autres organismes modèles ont contribué à une meilleure compréhension des dysfonctionnements induits par des mutations dans les gènes SDHx. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'inactivation du gène SDHB entraîne une augmentation de la production de ROS et une accumulation de succinate, responsable de l'inhibition d'enzymes de la famille des dioxygénases dépendantes de l' α -cétoglutarate, avec pour conséquence, une augmentation de la méthylation des histones (E. H. Smith, Janknecht, et Maher 2007). Ce modèle de levure a également été utilisé pour introduire des mutations de gènes SDHx identifiées chez des patients porteurs de PGL ou PCC. Les souches de levure mutées dans SDHB présentent une altération de leurs capacités oxydatives sévère ou modérée, associée à une diminution de l'activité SDH d'amplitude similaire. Elles présentent également une hypersensibilité à un stress oxydant induit par la ménadione (Panizza et al. 2013). Des mutations dans les gènes codant des protéines d'assemblage, tels que SDHAF1, SDHAF2 et SDHAF4, induisent également un déficit en SDH, une accumulation de succinate et une diminution de la respiration cellulaire (Ghezzi et al. 2009; Van Vranken et al. 2014; Hao et al. 2009).

Chez le ver *Caenorhabditis elegans*, les mutations P211H ou P211F du gène SDHB, équivalentes à celle causée par une substitution P197S dans les PGL humains, entraînent une altération de l'assemblage de la SDH et de son activité, une diminution de la respiration cellulaire, une augmentation de la production de ROS, une hypersensibilité au stress oxydant et une diminution de l'espérance de vie (J. Huang et Lemire 2009). La mutation Arg230His, également retrouvée dans les formes familiales de PGL chez l'être humain, conduit à une diminution du nombre de mitochondries, l'acquisition d'un phénotype glycolytique de type Warburg avec une augmentation des niveaux de pyruvate et de lactate. Elle s'accompagne d'un retard de développement et d'une diminution de l'espérance de vie (Saskó et al. 2020).

Chez la mouche *Drosophila melanogaster*, l'inactivation du gène SDHB est responsable d'un syndrome progéroïde incluant une altération comportementale liée à l'âge et une mortalité prématurée. Les muscles impliqués dans le vol, qui comptent parmi les tissus les plus énergétiques du règne animal, présentent des anomalies des mitochondries. Les mutants sont déficients en complexe II de la chaîne respiratoire des mitochondries et la chaîne de transport des électrons est altérée. Ces défauts sont associés à une augmentation de la production d' H_2O_2 (Walker et al. 2006).

Chez le poisson *Danio rerio*, la mutation homozygote du gène SDHB est viable mais conduit à une réduction de l'espérance de vie. Des modifications morphologiques sont observées, incluant une altération du gonflement des vessies natatoires, entraînant une réduction significative de l'activité ambulatoire. La muqueuse intestinale est également anormale avec des repliements muqueux plus courts et une densité accrue de cellules en gobelet indiquant une inflammation intestinale. Sur le plan biochimique, l'activité du complexe II est diminuée et s'accompagne d'une accumulation de succinate, comme cela est observé dans les PGL liés à une inactivation du gène SDHB (Dalla Pozza et al. 2020).

Plusieurs équipes ont tenté de développer des modèles de PGL associés à des mutations du gène SDHB chez les rongeurs dans le but de mieux comprendre l'étiologie et la physiopathologie de la maladie chez l'être humain, et de développer des thérapies ciblées (Lepoutre-Lussey et al. 2016; Lussey-Lepoutre et al. 2018). Des rongeurs porteurs d'une mutation hétérozygote d'un gène SDHx ne présentent aucune prédisposition au cancer comparable à celle décrite chez l'être humain. L'inactivation homozygote et donc complète de SDHB quant à elle, entraîne une létalité embryonnaire chez la souris, ce qui est également le cas chez le rat (Powers et al. 2020). La mise en culture de PGL et PCC humains n'a pas abouti à l'isolement de lignées cellulaires stables (Bayley et al. 2022). Un modèle cellulaire a cependant été construit à partir de PCC induits chez des rats hétérozygotes pour SDHB et irradiés aux rayons gamma (5 Gy) (Powers et al. 2020). Les tumeurs ont été greffées chez

des souris NGS et une lignée RS0 a été dérivée de ces xénogreffes. Cette lignée présente les caractéristiques des phéochromocytomes humains et constitue un modèle d'intérêt.

7.2 Inhibition : effets neurologiques de l'exposition expérimentale aux SDHs non pesticides

L'objet de ce paragraphe est d'évaluer si/comment les observations faites avec les inhibiteurs non-pesticides (malonate, 3-NP et TTFA) peuvent permettre de reconnaître et d'anticiper les conséquences attribuables à l'inhibition de la SDH par les pesticides SDHI.

Le 3-NP, inhibiteur pharmacologique irréversible de la SDH, est un composé initialement identifié comme responsable de foyers de pathologie des ganglions de la base due à l'ingestion de sucre de canne infecté par le champignon *Arthrinium fungus* en Chine, se manifestant notamment par une dystonie (He et al. 1995). De très nombreux travaux expérimentaux ont exposé le rat ou la souris au 3-NP comme un modèle de maladies neurodégénératives affectant le striatum telles la maladie de Huntington (MH) ou la dégénérescence nigro-striée (Brouillet et al. 1998; Fernagut et al. 2002). Les aires cibles recouvrent en partie celles affectées par des mutations des complexes de la chaîne respiratoire, une cible étant le striatum. Chez le rat exposé au 3-NP, Blum et al., ont montré une diminution significative de l'activité SDH dans toutes les zones du cerveau (striatum et cortex cérébral) et la diminution d'activité SDH était maximale dans la partie latérale du striatum coïncidant avec les lésions observées à l'examen histologique (D. Blum et al. 2001). Dans une étude ultérieure, Blum et al., ont montré, en contraste avec la perte spécifique des terminaisons neuronales dopaminergiques, la même densité de neurones immunoréactifs pour la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme impliquée dans la synthèse des neurotransmetteurs catécholamines, dont la dopamine, dans la substance noire (David Blum et al. 2004). Akopian et al., ont montré, chez le rat, des altérations précoces de la plasticité synaptique cortico-striatale, sans perte neuronale (Akopian et al. 2012). Chez la souris, Saydoff et al., ont montré aussi que le 3-NP entraînait une diminution de l'activité des complexes II et III, une altération des neurones et une diminution de l'activité des souris et de leurs performances motrices évaluées par le test Rotarod (Saydoff et al. 2003). Le modèle d'exposition au 3-NP a enfin fait l'objet de nombreux travaux chez des primates non humains relatifs à la MH (Dautry et al. 1999).

Le malonate, inhibiteur réversible de la SDH, administré chez le rat induit également une dégénérescence nigro-striée (Connop et al. 1996).

Par ailleurs, une étude récente a montré, parmi une série d'inhibiteurs chimiques des complexes mitochondriaux I à V examinés, la capacité du TTFA, inhibiteur du site de liaison de l'ubiquinone, à induire une dégénérescence du système nerveux dopaminergique au niveau cérébral et intestinal, après exposition subchronique répétée par voie orale, y compris chez des souris non transgéniques (Ahn et al. 2021).

Les mécanismes impliqués dans le développement des dommages neurologiques associés à l'utilisation des inhibiteurs non-pesticides de la SDH s'apparentent à ceux mis en évidence lors de l'excitotoxicité (Beal et al. 1993; Fernagut et al. 2002; Greene et al. 1993; Subramaniam 2020). La séquence d'excitation d'un neurone menant à l'excitotoxicité peut être schématisée ainsi : 1) le neurone au repos maintient un potentiel de membrane plasmique expliqué par de grands déséquilibres ioniques Na^+/K^+ , 2) : l'excitation cause l'ouverture de canaux ioniques, et des mouvements de charges (flux ioniques selon leurs gradients électrochimiques) initiant un potentiel d'action (dépoliarisation), 3) la fermeture de canaux dépoliarisant et l'ouverture de canaux repolarisant permettent le retour du potentiel de membrane au potentiel de repos (repolarisation), 4) si les capacités énergétiques du neurone sont insuffisantes, il ne peut

rétablir ou maintenir la situation ionique initiale, car les différences de gradients électrochimiques au repos sont maintenues par des 'pompes ioniques' contre les gradients électrochimiques et dépendantes de l'ATP. Dans ce cas, la dépolarisation est prolongée ce qui augmente le risque d'activité électrique anormale spontanée. Cela peut aggraver les conséquences délétères d'un défaut du métabolisme. La mort neuronale peut être immédiate mais surtout le déséquilibre calcique peut initier une séquence d'évènements menant avec un certain délai à une mort certaine (Ludhiadch et al. 2022; Angelova et al. 2019; Bano et Nicotera 2007; Doble 1999). Le stress oxydant est une composante de cette séquence (Ferber et al. 1999; P. Kumar et al. 2014; Maragos et al. 2004; Liot et al. 2009; Lim et al. 2008; Subramaniam 2020; Ahn et al. 2021; Colle et al. 2013).

L'ensemble des données concernant le 3-NP et le malonate montrent globalement la vulnérabilité particulière du striatum et la symptomatologie motrice associée à son atteinte, qui paraît au moins partiellement liée à l'inhibition de l'activité SDH. La spécificité striatale de la neurotoxicité n'est cependant pas absolue, comme en témoignent, par exemple, pour le 3-NP des données récentes montrant une atteinte corticale et hippocampique chez la souris C57Bl/6 exposée au 3-NP, associée à une pathologie de la protéine tau, protéine impliquée dans les tauopathies chez l'humain, et à une réaction neuroinflammatoire microgliale (Lahiani-Cohen et al. 2019).

Le TTFA, plus proche des fongicides SDHI que le 3-NP et le malonate, en termes de cible moléculaire dans la chaîne mitochondriale, induit des atteintes du système nerveux dopaminergique chez des souris (Ahn et al. 2021).

7.3 Atteinte des complexes mitochondriaux lors des maladies neurodégénératives chez l'être humain

Les travaux expérimentaux réalisés sur les inhibiteurs non pesticides de la SDH, comme le 3-NP et le malonate, montrent leur effet néfaste sur le système nerveux central. Par ailleurs, un grand nombre de données épidémiologiques et expérimentales ont indiqué une association entre exposition à des pesticides et maladie de Parkinson, une maladie le plus souvent sporadique, d'étiologie multifactorielle, ciblant particulièrement les neurones dopaminergiques du système nigro-strié (substance noire et striatum). Ce vaste ensemble d'études disponibles a permis à l'EFSA de conduire des travaux pour construire en particulier deux AOP (*Adverse Outcome Pathway*) à partir des exemples du paraquat et de la roténone (Terron et al. 2018; EFSA et al. 2017). Dans l'exemple de la roténone, ainsi que celui d'un autre agent chimique, le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), la liaison au complexe I mitochondrial est considérée comme l'évènement moléculaire clé initiateur des mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie. L'inhibition du complexe I et la dysfonction mitochondriale qui en résultent conduisent à la neuro-dégénérescence, dans un contexte où la déficience du complexe I mitochondrial a été rapportée dans la maladie de Parkinson (Schapira et al. 1989; 1990). En réalité, d'autres complexes mitochondriaux, notamment III et IV, peuvent aussi être impliqués dans la dysfonction mitochondriale (J.-L. Li et al. 2021). La séquence des évènements moléculaires mis en jeu à partir de la dysfonction mitochondriale aboutirait en tout cas à l'effet néfaste clinique le plus spécifique de la maladie de Parkinson, représenté par les troubles moteurs caractéristiques (bradykinésie, rigidité, tremblements au repos). Cette séquence implique également de façon importante des altérations de l'homéostasie protéique, dont participe en particulier l'accumulation d'une protéine, l'alpha-synucléine, sous une forme mal repliée. Cette protéine représente ainsi le constituant protéique majeur des lésions cellulaires caractéristiques de la maladie, dans les cytoplasmes (corps de Lewy) et les prolongements (neurites de Lewy) neuronaux. Une réaction neuro-inflammatoire (microgliose et astrogliose) participe aussi de façon majeure au processus lésionnel. Alors qu'il existe très

souvent des interactions réciproques entre ces différents mécanismes moléculaires, qui les exacerbent, le choix de la liaison au complexe I comme évènement initiateur dans la construction de l'AOP associé aux exemples de la roténone et du MPTP est motivé par le caractère majeur de l'inhibition du complexe I qui résulte de leur action, mais n'exclut pas d'autres évènements moléculaires initiateurs possibles. Le rôle initiateur et causal de la dysfonction mitochondriale peut ainsi être discuté, dans cette maladie qui apparaît à la fois comme une mitochondriopathie et une protéinopathie (J.-L. Li et al. 2021). A titre d'exemple, deux études récentes *in vitro* ont montré, pour l'une, l'induction directe par la roténone d'anomalies de repliement de l'alpha-synucléine, associée à sa cytotoxicité (Srivastava et al. 2020), et pour l'autre, une association préférentielle de l'alpha-synucléine sous sa forme mal repliée avec la mitochondrie (X. Wang et al. 2019), à l'origine d'un déficit fonctionnel mitochondrial. De façon intéressante, plaidant en revanche pour un rôle initiateur de la dysfonction mitochondriale, une autre étude récente a montré chez la souris que la délétion dans les neurones dopaminergiques du gène *Ndufs2* codant pour une sous unité essentielle du complexe I (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2) entraînait une perte progressive de leur phénotype, d'abord axonale, associés à des déficits moteurs progressifs (González-Rodríguez et al. 2021).

Alors que la maladie de Huntington présente un déterminisme génétique, il est important de souligner que les travaux historiques conduits avec le 3-NP (et le MPTP) représentaient plus largement l'une des voies d'approche, chez la souris (Stefanova et al. 2003) ou les primates non humains (Ghorayeb et al. 2000), dans la recherche difficile de modèles animaux d'une autre maladie le plus souvent sporadique, l'atrophie multisystématisée (AMS). Pouvant être de forme parkinsonienne (AMS-P) ou cérébelleuse (AMS-C) selon la localisation préférentielle des lésions cérébrales (dégénérescences nigro-striée ou olivo-ponto-cérébelleuse), cette maladie diffère de la maladie de Parkinson par ses caractéristiques lésionnelles et sa physiopathologie moléculaire. Elle est, en effet, fondamentalement caractérisée sur le plan lésionnel par des inclusions contenant l'alpha-synucléine mal repliée dans les cytoplasmes des oligodendrocytes, associée à une composante neuro-inflammatoire. Des données récentes paraissent impliquer le complexe II mitochondrial dans cette maladie.

Des mutations dans le gène codant CoQ2 ont été décrites dans des cas génétiques d'AMS, plus particulièrement en Asie où les formes cérébelleuses prédominent. Indépendamment d'une origine génétique, des niveaux réduits de co-enzyme Q10 ont par ailleurs été décrits dans le cervelet de patients atteints de formes sporadiques d'AMS-P et C (Barca et al. 2016; Schottlaender et al. 2016). Une déficience de CoQ10 est connue comme associée à une réduction de quantité/activité du complexe II dans d'autres pathologies (Monzio Compagnoni, Kleiner, Bordoni, et al. 2018).

Deux études, liées, ont été publiées par Monzio Compagnoni *et al.* en 2018, portant sur la biologie mitochondriale dans l'AMS. Elles soulignent l'importance potentielle du complexe II mitochondrial dans cette maladie particulière.

La première étude porte sur la caractérisation de cultures primaires de fibroblastes issues de biopsies cutanées provenant de patients d'AMS-P (n = 7) ou C (n = 7), ainsi que de 6 sujets appariés en âge (Monzio Compagnoni, Kleiner, Bordoni, et al. 2018). L'analyse spectrophotométrique de l'ensemble des enzymes respiratoires montre une réduction de la succinate CoQ réductase (complexe II) chez les patients, et une tendance, non significative, à la réduction d'activité succinate déshydrogénase (complexe II) et succinate c réductase (complexe II+III). Les analyses respirométriques montrent une tendance à la réduction de consommation d'O₂ dans les mesures impliquant le complexe II. L'évaluation par Western blot des complexes I à V montre une réduction uniquement significative pour le complexe II. Une réduction significative de coenzyme Q est observée par HPLC chez les patients (AMS-P et MSA-C), tandis qu'une augmentation de l'expression de 2 des 9 enzymes de biosynthèse examinées (COQ5 dans les ASA-P et C, COQ7 dans la AMS-C) est observée, qui pourrait refléter un mécanisme de compensation.

La seconde étude porte sur des neurones dopaminergiques produits à partir d'iPSC issues de fibroblastes cutanés de 4 patients atteints d'AMS-P (n = 2) ou C (n = 2) (Monzio Compagnoni, Kleiner, Samarani, et al. 2018). L'étude montre une altération des mécanismes d'autophagie et une atteinte mitochondriale dans les cellules issues des patients, plus importante chez les patients atteints d'AMS-P. Cette dernière se traduit, après analyse spectrophotométrique, par une altération de l'activité de la chaîne respiratoire au niveau des complexes II et II+III dans les cellules issues des patients, par comparaison à celle issues des 5 sujets contrôles, incluant une sœur jumelle de l'une des patientes. Une tentative de compensation de cette atteinte est indiquée par l'augmentation de masse mitochondriale, les quantités accrues des complexes II (SDHA et SDHB) et III, ainsi que de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse de CoQ10.

Ainsi, à l'instar des données associant la maladie de Parkinson à un déficit mitochondrial et qui peuvent impliquer des substances neurotoxiques affectant de façon majeure le complexe I mitochondrial, un lien entre l'AMS, maladie neuro-dégénérative beaucoup moins fréquente, et une déficience du complexe II mitochondrial est plausible ((Monzio Compagnoni, Kleiner, Bordoni, et al. 2018 ; Monzio Compagnoni, Kleiner, Samarani, et al. 2018).

8 Toxicité par organes

L'analyse des 14 SA permet la comparaison de leur toxicité par organe ou par système. Des effets toxiques communs ont été identifiés et sont décrits ci-dessous. Néanmoins, des effets retrouvés pour une substance en particulier sont décrits dans les sections « points d'attention spécifiques à la substance », dans les chapitres dédiés aux substances (section 6).

8.1 Toxicité hépatique

Sur les 14 composés de la famille des SDHI revus dans le cadre de cette saisine, plusieurs d'entre eux ont expérimentalement induit une hépatomégalie (augmentation du volume et du poids du foie) chez des animaux traités. La majorité des hépatomégalies identifiées se caractérisait par une hypertrophie des hépatocytes avec des changements biochimiques. Au total, 11 composés sur 14 ont induit une atteinte hépatique, retenue comme effet critique (Tableau 55). Trois SDHI (isofetamid, isopyrazam et pydiflumetofen) induisent une hypertrophie des hépatocytes, principalement centrolobulaire, associée à des anomalies biochimiques (augmentation de la bilirubine et/ou élévation de l'activité des enzymes hépatiques). Huit composés (benzovindiflupyr, bixafen, boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, penflufen, penthiopyrad, et sedaxane) ont induit une atteinte hépatique associée à une atteinte thyroïdienne. Des effets hépatiques ont également été observés dans des études n'ayant pas servi de base à la construction des VTR (ex. carboxine). Plusieurs substances SDHI ont induit des tumeurs hépatiques à des doses supérieures à celles retenues pour établir les VTR (notamment carboxine, fluxapyroxad, penflufen, penthiopyrad, pydiflumetofen, sedaxane).

D'après les dossiers réglementaires revus par le GT, l'induction des enzymes du métabolisme hépatique suite à une exposition aux SDHI repose sur l'activation de récepteurs et tout particulièrement CAR (constitutive androstane receptor) / PXR (pregnane X receptor). L'expression de CAR est très majoritairement retrouvée dans le tissu hépatique mais il est également présent au niveau du système nerveux central, de l'intestin, du rein et des poumons (Daujat-Chavanieu et Gerbal-Chaloin 2020). Son rôle extra-hépatique a été assez peu étudié.

Jusqu'à présent, les récepteurs impliqués dans un mode d'action (MOA) responsable de l'hépatocarcinogénèse chez les rongeurs sont CAR, PXR, PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) et AhR (aryl hydrocarbon receptor) (Lake 2018; Yamada, Cohen, et Lake 2021). De nombreuses études rapportent des interactions entre CAR et PXR, activés par un même agent avec un effet variable selon le récepteur. L'activation du récepteur CAR est l'un des contrôles de l'activité des enzymes CYP1A, CYP2B, CYP3A et CYP4A, d'autres récepteurs nucléaires étant aussi impliqués dans l'expression des enzymes hépatiques.

L'induction de mCAR chez les rongeurs comme mécanisme d'hépatocarcinogénèse et de la stimulation secondaire de la glande thyroïde est invoquée pour qualifier ces effets comme non pertinents pour l'humain (cf. section 0). Cette hypothèse repose sur la comparaison avec le phénobarbital qui est un activateur de CAR chez les rongeurs. Le rôle de CAR a été démontré dans le processus de la cancérogenèse hépatique chez les rongeurs alors que ce mécanisme ne serait pas retrouvé chez l'humain (L. Li et al. 2019; Ross et al. 2010). Le phénobarbital est cependant classé par le CIRC comme cancérigène possible (2B) en 2001, notamment au niveau cérébral chez l'humain (CIRC 2001). Les approches MOA liées aux approches « PB-like effects » sont donc à prendre avec précaution.

Afin de procéder à l'analyse de la toxicité des SDHI sur le foie, le GT a examiné les dossiers réglementaires au regard de la littérature scientifique.

Une étude sur le boscalid chez le poisson-zèbre décrit une hépatotoxicité associée à une baisse de l'activité SDH, de la synthèse d'acides gras et de la gluconéogenèse et une augmentation de la glycogénogenèse à 0,1 mg/L. A la dose plus faible de 0,01 mg/L, la beta-oxydation des acides gras serait augmentée. Ces altérations hépatiques ont des conséquences sur la concentration sanguine de glucose (Qian et al. 2021), qui est plus basse chez les animaux exposés.

En dehors des SDHI revus par le GT, une étude chez le poisson-zèbre avec le thifluzamide, un SDHI non autorisé en UE, montre des dommages hépatiques chez l'adulte après 21 jours d'exposition, avec une vacuolisation dans les hépatocytes, de la nécrose, des congestions de la veine centrale, une stase des sinusoides hépatiques (Yang Yang et al. 2016). Ces effets sont visibles dès 0,19 mg/L avec une relation dose-effet. Ces altérations s'accompagnent d'une baisse de l'activité SDH après 28 jours d'exposition (Yang Yang et al. 2016; 2020). En 2017, une étude supplémentaire portant sur une fonction hépatique majeure, la régulation glycémique, démontre une inhibition de la glycolyse aérobie et anaérobie, avec une augmentation de la glycogénogenèse et une stimulation de la voie des pentoses phosphate (Yang Yang et al. 2017). En 2018, il est noté également une baisse des triglycérides et du cholestérol total, associée à une baisse des activités de la lipase hépatique de la lipoprotéine lipase, de l'Acide Gras Synthase et de la carnitine palmitoyltransferase (CPT-I) (Yang Yang et al. 2018). D'autre part, le malonate, qui inhibe pharmacologiquement la SDH est également capable d'induire la NASH (Non-Alcoholic Steato Hepatitis) par accumulation de succinate et l'activation de GPR91 dans les cellules étoilées, selon un mécanisme dépendant de la sirtuin 3 (Li 2016).

En résumé, les études expérimentales analysées dans les dossiers réglementaires indiquent que l'exposition à la plupart des SDHI induit des effets hépatiques. Ces effets se caractérisent principalement par une hypertrophie des hépatocytes avec une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques.

Une position divergente concernant cette partie est présentée en annexe.

8.2 Effets sur la thyroïde

Des effets identifiés impliquant l'exposition aux SDHI étudiés dans le cadre réglementaire ont été étudiés sur une ou plusieurs espèces principalement : rat, souris, chien. La mise en évidence d'un possible effet sur la régulation de la fonction thyroïdienne repose sur les analyses suivantes : (i) poids relatif de la thyroïde, (ii) cytologie et histopathologie de la glande, (iii) dosages d'enzymes du métabolisme hépatique et dosages hormonaux (T3, T4 et TSH). En rapport avec l'implication des hormones thyroïdiennes (HT) dans de nombreuses fonctions et métabolismes, les conséquences d'une dysthyroïdie peuvent se manifester par des signes cliniques (poids, comportement, cardiaques...), des modifications de certains paramètres sanguins (cholestérol, calcémie...) et des effets sur le neurodéveloppement qui peuvent être observés selon le type d'expérimentation et le modèle animal.

Les perturbations de la fonction thyroïdienne par des agents chimiques résultent d'une action à des niveaux différents :

- (i) régulation hypothalamo-hypophysaire,
- (ii) synthèse des HT par la glande thyroïde,
- (iii) liaison aux transporteurs et distribution des HT aux différents tissus,
- (iv) métabolisme périphérique des HT (déiodation, conjugaison),
- (v) métabolisme cellulaire des HT et liaison aux récepteurs.

Dans les dossiers réglementaires relatifs aux SDHI, il est généralement mis en avant un mécanisme d'action chez les rongeurs passant par l'activation du récepteur nucléaire CAR, comme pour le phénobarbital, pour justifier de la non pertinence des effets thyroïdiens pour l'humain (McClain 1989). L'activation du récepteur nucléaire CAR déclenche l'induction transcriptionnelle d'enzymes du métabolisme hépatique de phase I (famille des cytochromes...), de phase II (UDPGT ou uridine diphospho-glucuronyltransférases, sulfotransférases...) et de phase III (transporteurs intervenant dans l'élimination de substances exogènes et endogènes). L'induction de UDPGT1A1 (UDPGT 1 polypeptide A1) participe à la clairance des HT (T3 et T4) par glucuro-conjugaison et élimination biliaire. La baisse des taux plasmatiques d'HT conduit à un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-pituitaire-thyroïdien avec une production compensatrice de TSH.

L'activation du récepteur nucléaire CAR participe au processus d'hyperplasie, ce qui peut faciliter le développement de tumeurs bénignes ou malignes hépatiques, mais aussi de tumeurs de la thyroïde du fait de l'augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes (adénomes, voire carcinomes) (Figure 19).

Ce mécanisme est généralement considéré comme non transposable à l'être humain. En effet, l'humain exprime la TBG (thyroxine binding globulin) sérique, une protéine qui assure le transport plasmatique des HT. La TBG est absente chez le rat, avec pour conséquence une demi-vie des HT plus courte chez le rat. De plus, chez l'humain, la glande thyroïde stocke une quantité élevée de thyroglobuline, ce qui limite le risque de déplétion en HT et l'induction par la TSH d'hyperplasie compensatrice (Hurley 1998).

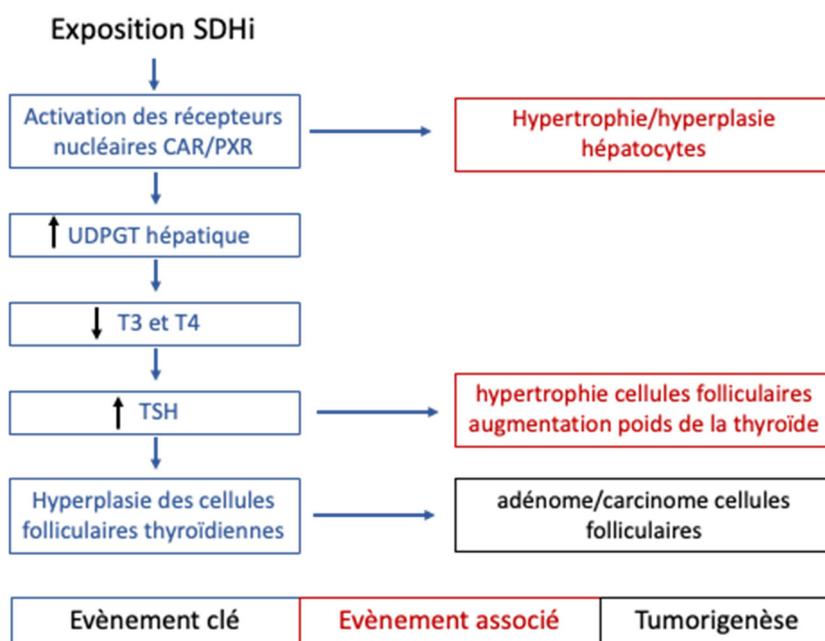


Figure 19 : Toxicité thyroïdienne des SDHI et MoA

8.2.1 Effets thyroïdiens comme effets critiques des VTR

Les études clés pour la détermination des VTR mentionnent diverses perturbations de la thyroïde qui sont retrouvées isolées ou associées : augmentation du poids relatif de la glande,

hypertrophie et/ou hyperplasie, altération du colloïde... Ces effets critiques sont présentés avec ceux du foie dans le Tableau 54: .

La majorité des SDHI étudiés présentent des effets sur la thyroïde, seuls ou en présence d'effets hépatiques, décrits dans les dossiers réglementaires. Pour 7 SDHI sur les 14 étudiés, les effets thyroïdiens apparaissent comme étant les effets les plus sensibles (effets critiques) dans les études disponibles dans les dossiers règlementaires et sont utilisés pour la dérivation de VTR : 3 SDHI (bixafen, boscalid, flutolanil) pour la dérivation d'AOEL et 5 SDHI (benzovindiflupyr, bixafen, fluopyram, penflufen, sedaxane) pour la dérivation de DJA. Pour 6 SDHI (benzovindiflupyr, bixafen, boscalid, fluopyram, penflufen, sedaxane), l'effet thyroïdien est retrouvé en présence d'un effet hépatique.

En première approximation, une présence simultanée d'une induction de TSH et d'un effet d'hypertrophie/hyperplasie hépatique peut évoquer un mode d'action partagé.

Tableau 55 : Effets critiques des SDHI sur la thyroïde et le foie retenus dans la détermination des VTR retenues par le GT

SDHI	Étude clé		Effet critique	
	AOEL	DJA	AOEL	DJA
Benzovindiflupyr	Rat 2G	Rat 2 ans	Foie (hypertrophie du foie), ...	Foie (incluant hypertrophie et vacuolisation), thyroïde (adénome), ...
Bixafen	Rat 90j	Rat 2 ans	Foie (hypertrophie) et thyroïde (hypertrophie des cellules folliculaires)	Foie (incluant hypertrophie et ↑ cholestérol) et thyroïde (altération colloïde)
Boscalid	Chien 1 an	Rat 2 ans	Foie (↑ poids et biochimie altérée), thyroïde (↑ poids), ...	Foie
Carboxin	Rat 90j	Rat 2 ans	Autres effets	Autres effets
Cyflumetofen	Rat 2G	Rat 2G	Autres effets	Autres effets
Fluopyram	Souris 90j	Rat 2 ans	Foie (effets sur le poids, sur biochimie et en histologie)	Foie, thyroïde (hypertrophies folliculaire et altération de la colloïde), ...
Flutolanil	Rat 90j	Rat 2 ans	Thyroïde (↑ poids relatif des glandes thyroïdiennes)	Autres effets
Fluxapyroxad	Rat 90j	Rat 2 ans	Foie (↑ poids, hypertrophie)	Foie (hypertrophie, adénomes hépatocellulaires)
Isofetamid	Chien 1 an (éval 90j)	Chien 1 an	Foie (↑ poids du foie, ↑ ALP et hypertrophie),...	Autres effets
Isopyrazam	Rat 2G	Rat 2 ans	Foie (↑ poids et hypertrophie), ...	Foie (incluant hypertrophie)

Penflufen	Chien 1 an	Rat 2 ans	Foie (hypertrophie)	Foie (incluant hypertrophie) et thyroïde (incluant altération de la colloïde)
Penthiopyrad	Rat 2G	Rat 2 ans	Foie (↑ poids relatif), ...	Autres effets
Pydiflumetofen	Lapin (développement)	Souris 1,5 ans	Autres effets	Foie (↑ poids et lésions histologiques), ...
Sédaxane	Rat 90j	Rat 2 ans	Autres effets	Foie (↑ poids absolu et/ou relatif, hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires) et thyroïde (hypertrophie des cellules folliculaires, colloïde basophile et desquamation de l'épithélium folliculaire), ...

2G : 2 générations ; [...] : autres effets associés

8.2.2 Effets hépatiques et thyroïdiens observés dans les études réglementaires

Les résultats des études impliquant les inter-relations entre le foie et la thyroïde sont rapportés dans le Tableau 57. Toutes les modifications histologiques, enzymatiques ou biologiques associées à un effet toxique sur le foie et la thyroïde ne sont pas rapportées dans ce tableau. L'intérêt est porté sur une induction des enzymes hépatiques de conjugaison (UDPGT), dépendante de l'activation du récepteur nucléaire CAR, afin de valider le mode d'action des dysthyroïdies, proposé dans les dossiers réglementaires.

L'exposition des rongeurs ou du chien par voie orale aux SDHI a conduit à une augmentation statistiquement significative du poids de la thyroïde et de celui de la parathyroïde pour 11 d'entre eux. Pour les trois SDHI n'induisant pas d'augmentation de poids (benzovindiflupyr, bixafen, penflufen), l'exposition est associée à des modifications histologiques de la glande thyroïde avec de plus, pour le benzovindiflupyr et le bixafen, des modifications des concentrations plasmatiques d'hormones (T3, T4, TSH) qui signent une atteinte de la régulation thyroïdienne. En revanche, parmi les SDHI qui sont associés à une augmentation du poids de la thyroïde plus celui de la parathyroïde, quatre d'entre eux (carboxine, cyflumetofen, flutolanil, isopyrazam) n'ont pas induit de modifications histologiques de la glande thyroïde, ou de variation des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes quand celles-ci sont dosées.

Des tumeurs thyroïdiennes sont rapportées pour 4 SDHI à des doses supérieures au point de départ d'une VTR :

- l'exposition au cyflumetofen est associée à une augmentation statistiquement significative de l'incidence de carcinomes des cellules C (ou parafolliculaires) de la thyroïde à la dose de 220 mg/kg pc/j chez le rat (30,6%). Cette observation n'a pas été prise en compte dans l'analyse du RAC sur la base des arguments suivants : (i) les tumeurs sont observées dans une seule espèce et un seul sexe (mâles), (ii) une incidence plus élevée des tumeurs bénignes est retrouvée aux fortes doses d'exposition mais les valeurs entrent dans la gamme des contrôles historiques), (iii) l'incidence chez les contrôles (18%) correspond à la valeur la plus élevée des contrôles historiques (RAC, 2017). En outre, il n'est pas observé d'effets sur le foie dans cette étude. Cependant, l'incidence observée chez les rats exposés est hors des HCD

(données de contrôles historiques) et il n'est pas exclu que l'effet cancérigène puisse être extrapolé à l'humain, ce qui a conduit au classement Carc. 2 (H351) de la substance active. Une étude sur 2 générations chez le rat montre, chez les femelles de la génération parentale (F0), une augmentation relative du poids de la thyroïde à la dose de 121,6 mg/kg pc/j, sans effet histologique associé. Le foie n'est pas non plus atteint.

- L'exposition à l'isofetamid ou au pydiflumetofen est associée au développement respectivement d'adénomes des cellules C ou d'adénomes de la thyroïde chez le rat. La valeur de l'incidence entre dans la gamme des contrôles historiques présentés dans le dossier. Des effets hépatiques sont également retrouvés de manière simultanée. En outre, une induction des UDPGT a conduit l'État membre rapporteur du pydiflumetofen à considérer cet agent avec un MOA similaire à celui du phénobarbital. Cependant, le pydiflumetofen est classé Carc. 2 (H351).
- l'exposition chronique à l'isopyrazam est associée au développement d'adénomes de la thyroïde (12% chez les mâles à la dose de 173 mg/kg pc/j) mais l'incidence est proche de celles des contrôles historiques du laboratoire (16-9,6%, 3 études 2007-2009), et une absence de relation dose-effet a été invoquée pour ne pas prendre en compte cet effet. Cependant, l'isopyrazam est classé Carc. 2 (H351).

De plus, les personnes portant des mutations sur l'un des 4 gènes codant la SDH présentent un risque augmenté de cancers papillaires de la thyroïde (Ni et al. 2015).

8.2.3 Incertitudes sur un mode d'action « phenobarbital-like » des SDHI

Si le MoA chez les rongeurs mentionné dans les dossiers réglementaires rappelle celui du phénobarbital, cette conclusion peut être discutée sur la base de :

- (i) lacunes expérimentales ou de résultats incohérents
- (ii) d'effets sur la glande thyroïde observés chez le chien

Une synthèse de résultats expérimentaux est présentée dans le tableau 56.

Tableau 56. Schéma récapitulatif des données correspondant à un effet sur la glande thyroïde

SDHI	PARAMÈTRES					
	T3	T4	TSH	CYP2B CYP3A	CAR	UDPGT
Benzovindiflupyr						
Bixafen						
Boscalid						
Carboxin						
Cyflumetofen						
Fluopyram						
Flutolanil						
Fluxapyroxad						
Isofetamid						
Isopyrazam						
Penflufen						
Penthiopyrad						
Pydiflumetofen						
Sedaxane						

	Absence de donnée
	Valeurs significatives et cohérentes
	Valeurs significatives mais incohérentes avec l'endocrinologie

○ Mode d'action validé au plan expérimental

Des données mécanistiques sont disponibles dans les dossiers réglementaires du boscalid et du benzovindiflupyr confirmant ce mécanisme d'action. En effet, les événements clés observés chez les rongeurs (concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes, hépatomégalie associée à une augmentation d'activité des enzymes de phase II, hypertrophie/hyperplasie des thyrocytes) sont rapportés pour ces 2 SDHI. L'induction des enzymes hépatiques après exposition aux SDHI est probablement contrôlée par le récepteur CAR, bien que ce ne soit pas le seul régulateur d'expression des enzymes de phase I, II et III du métabolisme hépatique. L'hypothèse d'une perturbation endocrinienne du benzovindiflupyr a été soulevée tenant compte des effets reprotoxiques et de toxicité sur le développement périnatal. Un lien entre une perturbation de la régulation thyroïdienne et un effet sur le neurodéveloppement pourrait être évoqué.

Le boscalid est inducteur des enzymes hépatiques de phase I et II chez les rats mâles et femelles exposés pendant 28 jours. Cette induction des enzymes hépatiques est associée à une diminution de T4, une augmentation de TSH ainsi qu'à une augmentation de l'incidence des adénomes des cellules folliculaires chez les rats mâles.

○ Mode d'action incomplètement validé au plan expérimental

Pour 11 SDHI, il existe des données dans les dossiers réglementaires permettant de confirmer partiellement ce mode d'action :

- L'exposition au bixafen a conduit à une augmentation de la TSH chez le rat (à 130 mg/kg pc/j) dans une étude de 90 jours. Une étude mécanistique de 14 jours conduite chez le rat (à la dose de 150 mg/kg pc/j) montre chez les femelles, une augmentation de la TSH dès le 3^{ème} jour d'exposition, avec une faible diminution de T3 au même jour. Cet effet n'est pas retrouvé au 7^{ème} et 14^{ème} jour et il n'y a pas d'effet sur T4. Chez les mâles, il est rapporté une faible diminution de T4 au 14^{ème} jour, pas d'effet sur T3 et une augmentation de TSH au 14^{ème} jour. L'étude de toxicité chronique 2 ans chez le

rat montre des effets sur la thyroïde (altération du colloïde) chez les mâles et les femelles aux doses intermédiaires (12,1 et 17,4 mg/kg pc/j).

- L'exposition au cyflumetofen est associée au développement de carcinomes des cellules C thyroïdiennes chez le rat mais aucun dosage des enzymes du métabolisme hépatique n'a été réalisé pour valider le mode d'action impliquant l'activation de CAR.
- Pour le fluopyram, le fluxapyroxad, l'isofetamid, le penthiopyrad et le sedaxane, une induction des enzymes hépatiques de phase I et II est observée mais les dosages de TSH, T3 et T4 donnent des résultats incohérents (voir Tableau 57: par exemple une augmentation du taux sanguin de TSH avec une augmentation contemporaine de T4).
- L'activité des enzymes hépatiques de phase I et II est induite par le pydiflumetofen mais aucun dosage des HT n'est rapporté.
- Pour le penflufen, seules les activités des enzymes de phase I sont rapportées et aucun dosage des HT n'a été rapporté.
- Pour l'isopyrazam, l'effet est considéré comme fortuit dans le dossier réglementaire et en conséquence les dosages (HT, enzymes de phase II, activation de CAR) n'ont pas été réalisés.
- Pour le flutolanil, seule une augmentation du poids de la thyroïde chez le rat est observée, sans modification histologique, ni augmentation de TSH. Cette substance active n'est pas considérée comme toxique pour la thyroïde. Cependant, une étude chez le poisson zèbre montre que l'exposition aiguë au flutolanil entraîne des altérations de biomarqueurs signataires d'une perturbation de la régulation thyroïdienne : TRH (thyroid releasing hormone), TSHR (thyroid stimulating hormone receptor), TPO (thyroid peroxidase), Dio1 (dioxigenase 1), TR α (thyroid hormone receptor alpha) et UGT1ab. Ce résultat illustre l'intérêt de tester plusieurs modèles pour répondre à la question d'un effet perturbateur thyroïdien (Teng et al. 2018).

Afin de tester l'hypothèse mécanistique sous-jacente, des expérimentations complémentaires ont été réalisées pour certains SDHI, avec le dosage de la TPO (thyroxine peroxydase) ainsi que l'utilisation de souris KO pour CAR/PXR et humanisées exprimant hCAR/hPXR (Tableau 56Tableau 57).

- Effets sur la thyroïde du chien

Des expérimentations ont été conduites chez le chien (90 jours, 1 an) avec les résultats suivants :

- Une augmentation du poids de la thyroïde, une hypertrophie diffuse et une hyperplasie focale des cellules folliculaires suite à une exposition au boscalid, au penthiopyrad et au pydiflumetofen. Dans ces études, aucun dosage des HT n'est rapporté.
- Des modifications cytologiques et histopathologiques sont observées, sans augmentation de poids de la thyroïde, chez des chiens exposés au fluopyram, à l'isofetamid, au penflufen et au sedaxane. Comme pour les composés précédents, aucune recherche d'un MOA n'a été envisagée.

L'enchaînement des évènements commençant par une induction enzymatique au niveau du foie et conduisant à une dérégulation de la thyroïde est spécifique aux rongeurs. En conséquence, si un effet est observé sur la thyroïde des chiens, le mécanisme devrait être différent et aurait dû conduire à une investigation additionnelle.

Tableau 57 : Effets des SDHI sur la thyroïde et le foie d'après les études court ou long terme chez les rongeurs et/ou le chien

SDHI	Étude	Thyroïde					Foie			Explication d'une absence d'extrapolation à l'humain	Remarques
		↑ Poids	histologie	Hormones	Cibles enzyme	Tumeur	Toxicité	↑ enz phase I	↑ enz phase II		
Benzovindiflupyr	Rat 28j, 90j, 2 ans	non	Oui	↓ T3, T4 ↑ TSH	TPO nég	Thyroïde : adénome cellules folliculaires	↑ poids cytologie	nd	UDPGT	Adénome chez rat mais pas souris, UGT : foie > thyroïde	Adénome rat/souris : résultat inverse avec le phénobarbital
Bixafen	Rat 90 j, 2 ans Souris 1,5 an	non	Oui	↑ TSH	nd	adénome, carcinome (rat F)	poids cytologie	BROD, PROD	nd	Foie > thyroïde ; légère incertitude; valeur cancéro (rat F) dans valeur haute HCD	Alimentation déficiente en vit K. Mortalité env 50% étude 2 ans (2008). Données de mauvaise qualité. HCD non acceptable (2002)
Boscalid	Chien 1 an Rat 2 ans	Oui (chien et rat)	Oui (chien et rat)	rat ↓ T3, T4 ↑ TSH	nd	adénome (rat)	poids cytologie	EROD, PROD, BROD	pNP-GT, MUF-GT, HOBI-GT	HCD (20 ans) rat F, non génotoxique, non mutagène	HCD non acceptable. Non génotoxique mais effets épigénétiques.
Carboxin	Rat 90 j, 2 ans Souris 1,5 an	oui chien mâle, 4 semaines	Non	nd	nd	nd	poids cytologie	nd	nd	nd	DJA basée sur étude 2 ans rat néphrotoxicité, hyperplasie parathyroïde
Cyflumetofen	Rat 28j, 2 ans	Oui (28j,#1)	Non	nd	nd	Carcinome cellules C (M)	poids (M et F), cytologie	nd	nd	nd	Absence de conclusion en histologie pour les études (expérience #1 ,rats M et 2G) : aucun effet ?

SDHI	Étude	Thyroïde					Foie			Explication d'une absence d'extrapolation à l'humain	Remarques
		↑ Poids	histologie	Hormones	Cibles enzyme	Tumeur	Toxicité	↑ enz phase I	↑enz phase II		
		non (rat #2) oui (2G F0)									
Fluopyram	Rat 90j, 2 ans Souris 1,5 an Chien 1 an	Oui (rat)	Oui (rat, chien M)	Rat ↑ TSH ↑ T3, T4 Souris T4, TSH =	TPO neg	Adénome (rat et souris) carcinome (souris M)	Poids, cytologie	BROD, PROD, EROD	UDPGT (souris)	Souris CAR/PXR KO et cellules > effet activation CAR. MoA : PB-like	Taux sanguin des HT en contradiction avec le mécanisme de rétro-contrôle de T3/T4 versus TSH
Flutolanil	Rat 90j Chien 90j	Oui (rat, chien)	Non	TSH = (rat)	nd	nd	Poids Cytologie (chien)	nd	nd	Poids (rat) pris en compte pour AOEL. Pas extrapolation pour l'humain	PE chez poisson zèbre. Absence relation poids/histologie
Fluxapyroxad	Rat 28j, 90j, 2ans	Non (28j, 90j) oui (2 ans M)	Oui (28j, 90j)	↑ TSH, T3 et T4	TPO neg	Carcinome cellules folliculaires (M)	Poids Cytologie	BROD, PROD, EROD	T4-UDP-GT	Non cancérigène chez souris. Hypertrophie/hyperplasie thyroïde secondaire à activation d'UGT.	Taux sanguin des HT en contradiction avec le mécanisme de rétro-contrôle de T3/T4 versus TSH
Isofetamid	Rat 28j, 90j, 2 ans, 2G	Oui (rat 1 et 2 ans, P)	Oui (rat,	↓ T4	nd	Cellules C adénome	Poids	CYP-450	UDPGT (rat M 28j)	UGT : foie > thyroïde, adénome cellules C dans HCD, pas dose-réponse	HCD sur 10 ans, incidence adénome cellules C 9,8% M et 11,8% F au-delà des valeurs HCD.

SDHI	Étude	Thyroïde					Foie			Explication d'une absence d'extrapolation à l'humain	Remarques
		↑ Poids	histologie	Hormones	Cibles enzyme	Tumeur	Toxicité	↑ enz phase I	↑enz phase II		
	Souris 90j Chien 90j	et F1 rat 2G)	souris, chien)	TSH et T3 = (rat M 28j)			Cytologie (rat)	(rat M 28j)			Absence de dosages HT. Effet hyperossification dans étude 2G. Dosage HT ?
Isopyrazam	Rat 28j , 90j, 2 ans, 2G	Oui (90j)	Non	nd	nd	Adénome Carcinome (M)	Poids Cytologie	BROD, PROD, EROD	nd	Forte dose (12%), pas effet dose ; HCD (3 études) 1,6-9% mais valeur dans RITA (1983-2003). PB-like	Absence étude KO CAR/PXR, thyroïde adénome forte dose mais carcinome dose intermédiaire. Absence dosage UDPGT. Absence relation poids/histologie
Penflufen	Rat 90j, 2 ans Souris 2j, 90j, 1,5 an Chien 8j, 90j, 1 an	non	Oui (rat 90j, 1 an et chien 28j, 1 an)	nd	Nd	Adénome (souris F)	Poids, Cytologie (3 espèces) Adénome (rat, souris) carcinome (souris)	BROD, PROD	nd	PB-like	Absence dosage UDPGT, HT. Effet chez le chien : histologie thyroïde. Faible taux de survie dans l'étude rat 2 ans.
Penthiopyrad	Rat 90j, 2 ans, 2G Souris 90j, 1,5 an Chien 18j, 1 an (90j)	Oui (souris, chien F 90j)	Oui (rat, souris, chien 90j F)	↓ T4, ↑ TSH	Nd	Adénome (rat M)	Poids Adénome/ carcinome (rat, souris) Tumeurs (chien)	PROD	UDPGT	Valeur légèrement supérieure HCD, seuls M sont affectés, UGT = foie>thyroïde ; PB-like	Dosages hormonaux : une seule étude. ↓ T4 (7 et 14j) à forte dose et augmentation de TSH (7j). Phase récupération T4 taux normal et TSH taux * 2.5 fois (n.s). Dosage HT ?

SDHI	Étude	Thyroïde					Foie			Explication d'une absence d'extrapolation à l'humain	Remarques
		↑ Poids	histologie	Hormones	Cibles enzyme	Tumeur	Toxicité	↑ enz phase I	↑enz phase II		
Pydiflumetofen	Rat 90j, 2 ans, 2G Souris 90j, 1,5 an Chien 90j, 1 an	Oui (rat F0 et F1, 2G ; chien M 90j)	oui (rat 90j, F0 et F1,2G)	nd	TPO neg	Adénome (F0 rat F, 2G)	Poids Cytologie (3 espèces) carcinome adénome (souris M)	PROD BROD (souris)	UDPGT (rat M)	Valeur incidence adénome dans HCD (7 études 2009-2015); PB-like	Doses faibles pour étude cancérogène 2 ans. Etude UDPGT chez M, tumeurs chez F. MoA sur cellules humaines mais d'un seul donneur. Possible implication en cancérogène du métabolite 2,4,6-TCP
Sédaxane	Rat 90j, 2 ans, 2G Souris 90j, 1., an Chien 90j, 1 an	Oui (rat)	Oui (rat, chien 90j)	↓ T3, T4 TSH =	TPO neg	Adénome cellules folliculaires (rat M)	Poids cytologie (rat) Adénome (rat, souris) Carcinome (souris M)	PROD BROD (rat, souris)	UDPGT (rat)	Induction enzymes phase I et II, induction phase S hépatocytes (rat), induction CAR et PXR (gènes rapporteurs in vitro) PB-like	Absence d'étude sur CAR/PXR KO. Essai de prolifération à partir d'un seul donneur d'hépatocytes humains. ↓ T3 à J2, 4, 8, 15 (rat) mais T4 seulement à J2. Etude 28j (rat) pas d'effet sur les taux d'HT (FT3, TT3, FT4, TT4 et TSH). Effet chez le chien à 90j (mais pas à 1 an).

TPO : thyroïde peroxydase ; PB : phénobarbital ; enzymes hépatiques de phase I : BROD : benzyloxyrésorufin O-déalkylation, PROD: pentoxyrésorufin O-déalkylation; BROD et PROD sont des biomarqueurs d'une induction de CYP2B et CYP3A ; EROD : éthoxyrésorufin O-dééthylation est un biomarqueur d'une induction de CYP1A1; enzyme hépatique de phase II : UDPGT : uridine 5'-diphospho-glucuronyltransférase ; F : femelles ; M : mâles ; 2G : étude sur 2 générations ; n.s : non statistiquement significatif ; nd: non déterminé

- Autres résultats

On ne peut pas exclure que certains SDHI soient des perturbateurs thyroïdiens indépendamment de l'inhibition de la SDH, comme cela est suggéré par les travaux de l'EPA à travers leur programme (U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program).

En résumé, concernant la toxicité sur la thyroïde, le GT considère que la transposabilité des effets observés chez les rongeurs à l'être humain ne peut pas être exclue sur la base des données disponibles. En effet, l'hypothèse généralement avancée dans les dossiers réglementaires est basée sur une induction enzymatique hépatique, mode d'action similaire à celui du phénobarbital. Cependant, cette hypothèse n'a pas été systématiquement investiguée en particulier lorsque les résultats des dosages ne validaient pas ce mode d'action. De plus, pour certains SDHI, des effets sont retrouvés chez le chien, dont la régulation de la fonction thyroïdienne est proche de celle de l'humain. Cela constitue des informations qui mériteraient des investigations complémentaires sur la régulation thyroïdienne chez le chien. Ainsi, chez l'humain, des incertitudes persistent sur une potentielle perturbation de la régulation thyroïdienne.

Une position divergente concernant cette partie est présentée en annexe.

8.3 Effets sur les surrénales

Les effets des SDHI sur les glandes surrénales ont particulièrement retenu l'attention du GT car c'est à partir des cellules chromaffines de la zone interne de la glande surrénale (médullosurrénale) que peuvent se développer des phéochromocytomes lorsqu'un des gènes SDHx est muté à l'état homozygote, entraînant une inactivation de l'enzyme.

D'après les données de la littérature, les phéochromocytomes peuvent apparaître avec une fréquence relativement élevée lors du vieillissement chez le rat mâle. Ainsi, Greim *et al.* rapportent des études montrant une incidence d'environ 10 % et 29 % chez le rat Wistar après 24 et 30 mois, respectivement (Greim et al. 2009). Cette revue générale indique également que les phéochromocytomes apparaissent avec une fréquence relativement élevée chez le rat mâle exposé à certaines substances chimiques, particulièrement lorsque sont impliqués certains processus incluant l'hypoxie, le découplage de la phosphorylation oxydative ou les perturbations de l'homéostasie calcique. Ces mécanismes ont été clairement identifiés comme impliqués dans le développement de phéochromocytomes chez l'humain lors d'une inactivation génétique de la SDH. Ils pourraient donc être également attendus après son inhibition chimique par les SDHI, en fonction de leurs propriétés toxicocinétiques. Le GT considère donc que l'augmentation de l'incidence de cette forme de tumeurs, même si non significative (en raison d'un nombre d'animaux par groupes insuffisant) est particulièrement pertinente à souligner.

Dans la plupart des dossiers analysés, les études d'ADME montrent une distribution marquée, plus ou moins transitoire, dans les glandes surrénales.

Des effets sur les surrénales sont rapportés dans les dossiers réglementaires pour la majorité des SDHI considérés. En particulier, des altérations histologiques (statistiquement significatives et/ou observées dans la majorité des animaux testés si le résultat statistique n'est pas spécifié dans le DAR) sont rapportées avec le benzovindiflupyr, le cyflumetofen, le fluopyram, le fluxapyroxad, l'isofétamid, le penthiopyrad. Les effets sur les surrénales sont utilisés pour l'élaboration de l'AOEL et de la DJA pour le cyflumetofen. Pour les autres substances, ces effets apparaissent à des doses supérieures aux NOAEL retenues pour l'élaboration des VTR.

Le détail des effets est présenté ci-dessous :

- **Benzovindiflupyr** : dans l'étude réalisée sur 2 générations chez le rat exposé dans l'alimentation à des doses entre 25 et 600 ppm chez les mâles ou 25 et 250 ppm chez les femelles, une augmentation de l'incidence d'hypertrophie de la zone glomérulaire des surrénales est observée chez les femelles de la génération F1 (11/25 *versus* 4/25 chez les contrôles) à la plus forte dose testée (250 ppm correspondant à 40 mg/kg pc/j). La significativité statistique n'est pas rapportée dans le DAR. L'effet apparaît à une dose supérieure à la NOAEL (25 ppm correspondant à 1,2 mg/kg pc/j) retenue par le GT pour dériver l'AOEL à partir de cette même étude.
- **Bixafen** : dans l'étude de toxicité chronique et de cancérogénèse sur 2 ans chez le rat exposé dans l'alimentation à des doses entre 50 et 2000 ppm, divers effets sur les surrénales sont observés. Une augmentation statistiquement significative du poids relatif et absolu des surrénales est rapportée chez les rats mâles à 12 mois (effet non retrouvé à 24 mois) à la plus forte dose testée (2000 ppm correspondant à 80,5 mg/kg pc/j). Des phéochromocytomes bénins et malins sont également rapportés chez les rats mâles dans cette étude (voir tableau ci-dessous). L'augmentation d'incidence dans les 3 groupes exposés (1,67 à 5 % de l'effectif) n'est pas statistiquement significative, avec une puissance statistique limitée (42 %) compte-tenu des effectifs d'animaux disponibles²⁸.

Tableau 58 : Tumeurs surrénaliennes chez le rat mâle exposé pendant 24 mois au bixafen

Dose (ppm)	0	50	300	2000
Phéochromocytomes bénins	0/60	3/60	1/60	2/60
Phéochromocytomes malins	0/60	0/60	0/60	1/60
Adénomes (zone fasciculée)	0/60	2/60	1/60	1/60

Tableau : Tumeurs surrénaliennes chez le rat mâle exposé pendant 24 mois au bixafen

- **Boscalid** : dans l'étude de 90 jours réalisée chez le rat par voie orale à des doses comprises entre 100 et 15000 ppm, le poids absolu et relatif des surrénales est statistiquement diminué chez les mâles dès la dose de 5000 ppm (347-395 mg/kg pc/j). A contrario, le poids absolu et relatif des surrénales est statistiquement augmenté chez les mâles à toutes les doses testées dans l'étude de 18 mois chez la souris réalisée par voie orale à des doses comprises entre 80 et 8000 ppm (80 ppm correspondant à 13-18 mg/kg pc/j). Ces effets sur le poids des surrénales ne sont pas cohérents entre les deux études et ne sont pas associés à des effets histopathologiques.
- **Cyflumetofen** : une hypertrophie et une vacuolisation des corticosurrénales sont observées dans toutes les espèces testées (souris, rat, lapin, chien), quelle que soit la durée de l'exposition (courte et longue) (voir tableau ci-dessous). Ces effets sont soit statistiquement significatifs, soit retrouvés chez la majorité des animaux testés (quand le résultat statistique n'est pas spécifié dans le DAR). La plus faible LOAEL est de 34,6 mg/kg pc/j, issue de l'étude sur deux générations chez le rat. Ces effets servent de base pour l'élaboration de l'AOEL et de la DJA.

Tableau 59: Résumé des effets observés sur les surrénales avec le cyflumetofen

²⁸ Pour mettre en évidence une différence de proportion attendue de 5 % entre un groupe témoin dont la proportion de tumeurs est de 0 % et le groupe exposé, avec un seuil de significativité de 5 % et une puissance de 80 %, un échantillon de 152 individus par groupe serait nécessaire. Calculs réalisés avec la fonction `power.prop.test` du package `stats` sous R (R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

Effet et incidence à la LOAEL	LOAEL	Etude
Vacuolisation corticale diffuse (12/12 animaux atteints à la LOAEL)	1000 ppm (981-1000 mg/kg pc/)	14 jours chez le rat, voie orale (6/sexe/groupe) 0, 1000, 10000 ppm
Vacuolisation corticale diffuse (12/12 animaux atteints à la LOAEL) Hypertrophie corticale (6/6 femelles atteintes à la LOAEL)	1000 ppm (75,1-79,8 mg/kg pc/j)	28 jours chez le rat, voie orale (6/sexe/groupe) 0, 100, 500, 1000, 5000 ppm
Vacuolisation corticale diffuse (1/6 mâle et 5/6 femelles atteintes à la LOAEL) Hypertrophie corticale (4/6 mâle et 6/6 femelles atteintes à la LOAEL) Hyperplasie des cellules subcapsulaires (1/6 femelle atteinte à la LOAEL)	5000 ppm (663-763 mg/kg pc/j)	28 jours chez la souris, voie orale (6/sexe/groupe) 0, 100, 500, 1000, 5000 ppm
Fines vacuoles des cellules corticales dans les zones fasciculaires et réticulées (2/3 mâles et 3/3 femelles atteintes à la LOAEL) Fines vacuoles des cellules corticales dans la zone glomérulaire (1/3 mâle et 0/3 femelles atteintes à la LOAEL)	300 mg/kg pc/j	28 jours chez le chien, voie orale (3/sexe/groupe) 0, 100, 300, 1000 mg/kg pc/j
Vacuolisation corticale diffuse (6/10 mâles atteints à la LOAEL) Hypertrophie corticale diffuse (10/10 femelles atteintes à la LOAEL) Vacuolisation des cellules interstitielles (1/10 femelles atteinte à la LOAEL)	1000 ppm (54,5-62,8 mg/kg pc/j)	13 semaines chez le rat, voie orale (10/sexe/dose) 0, 100, 300, 1000, 3000 ppm
Vacuolisation corticale diffuse (2/10 femelles atteintes à la LOAEL) Hypertrophie corticale diffuse (1/10 mâles atteints à la LOAEL)	3000 ppm (348-447 mg/kg pc/j)	13 semaines chez la souris, voie orale (10/sexe/dose) 0, 300, 1000, 3000, 10000 ppm
Fines vacuoles des cellules corticales dans les trois zones (4/4 mâles et 1/4 femelles atteintes à la LOAEL) Fines vacuoles des cellules corticales dans les zones fasciculées et réticulées (0/4 mâle et 1/4 femelles atteintes à la LOAEL) Larges vacuoles des cellules corticales dans la zone fasciculée (3/4 mâle et 3/4 femelles atteintes à la LOAEL)	1000 mg/kg pc/j	13 semaines chez le chien, voie orale (4/sexe/dose) 0, 30, 300, 1000 mg/kg pc/j
Infiltrats cellulaires (1/4 mâle et 2/4 femelles atteintes à la LOAEL) Fibroses interstitielles (0/4 mâle et 2/4 femelles atteintes à la LOAEL) Fines vacuoles des cellules corticales (8/8 animaux atteints à la LOAEL) Larges vacuoles des cellules corticales (2/4 mâle et 2/4 femelles atteintes à la LOAEL) Dégénérescence des cellules corticales (1/4 mâle et 2/4 femelles atteintes à la LOAEL) Macrophages chargés en pigment (1/4 mâle et 0/4 femelles atteintes à la LOAEL)	300 mg/kg pc/j	12 mois chez le chien, voie orale (4/sexe/dose) 0, 30, 300, 1000 mg/kg pc/j
Vacuolisation des cellules corticales (8/19 mâles atteints à la LOAEL)	1500 ppm	12 mois chez le rat, voie orale (20/sexe/dose)

Hypertrophie des cellules corticales (1/19 mâle et 20/20 femelles atteints à la LOAEL)	(56,8-69,2 mg/kg pc/j)	0, 50, 150, 500, 1500 ppm
Hypertrophie corticale (16/41 mâles et 22/45 femelles atteints à la LOAEL)	1500 ppm (49,5-61,9 mg/kg pc/j)	24 mois chez le rat, voie orale (50/sexe/dose) 0, 150, 500, 1500 ppm
Vacuolisation corticale (8/52 mâles et 26/52 femelles atteints à la LOAEL)	5000 ppm (483-537 mg/kg pc/j)	18 mois chez la souris, voie orale (52/sexe/dose) 0, 150, 1500, 5000 ppm
Hypertrophie de la zone glomérulaire dans la génération parentale (4/24 mâles et 13/24 femelles atteints à la LOAEL)	500 ppm (34,6-39,7 mg/kg pc/j)	2 générations chez le rat, voie orale (24/sexe/dose) 0, 150, 500, 1500 ppm
Hypertrophie de la zone fasciculaire dans la génération parentale (0/24 mâles et 10/24 femelles atteints à la LOAEL)		
Vacuolisation de la zone fasciculaire dans la génération parentale (9/24 mâles et 0/24 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone glomérulaire chez les petits F1 (6/23 mâles et 3/23 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone fasciculaire chez les petits F1 (8/23 mâles et 7/23 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone glomérulaire chez les F1 adultes (9/24 mâles et 7/24 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone fasciculaire chez les F1 adultes (0/24 mâles et 7/24 femelles atteints à la LOAEL)		
Vacuolisation de la zone fasciculaire chez les F1 adultes (3/24 mâles et 0/24 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone glomérulaire chez les petits F2 (6/21 mâles et 0/21 femelles atteints à la LOAEL)		
Hypertrophie de la zone fasciculaire chez les petits F2 (8/21 mâles et 4/21 femelles atteints à la LOAEL)		
Vacuolisation cytoplasmique diffuse (2/25 femelles atteintes à la LOAEL)	250 mg/kg pc/j	Tératogénicité chez le rat, voie orale (25 femelles/dose) 0, 50, 250, 1000 mg/kg pc/j

- **Fluopyram** : dans une étude sur 28 jours réalisée chez la souris exposée dans l'alimentation à des doses comprises entre 150 et 5000 ppm, une hypertrophie de la zone fasciculaire est rapportée chez les femelles (3/5) dès la dose de 1000 ppm (soit 197 mg/kg pc/j). Une augmentation statistiquement significative du poids relatif des surrénales chez les mâles et une vacuolisation corticale chez les femelles (10/10) sont observées à la dose de 1000 ppm (188-216 mg/kg pc/j) dans l'étude par voie orale sur 90 jours réalisée chez des souris exposées entre 30 et 1000 ppm. Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.
- **Flutolanil** : une diminution statistiquement significative du poids absolu et relatif des glandes surrénales est observée dans l'étude d'exposition cutanée sur 28 jours chez le rat, réalisée à la dose de 1000 mg/kg pc/j. Une augmentation statistiquement significative du poids absolu des surrénales est notée chez les femelles à la plus forte dose testée dans l'étude sur 2 ans chez le chien, réalisée par voie orale, à des doses comprises entre 50 et 1250 mg/kg pc/j. Ces effets sur le poids des surrénales ne sont pas cohérents entre les deux études et ne sont pas associés à des effets histopathologiques. Quelques phéochromocytomes (non statistiquement significatif) sont rapportés chez le rat mâle dans

l'étude sur 2 ans réalisée à des doses entre 40 et 10000 ppm (soit une dose maximale comprise entre 460,5-535,8 mg/kg pc/j).

- **Fluxapyroxad** : dans l'étude sur 2 générations réalisée chez le rat par voie orale à des doses comprises entre 10 et 300 mg/kg pc/j, une augmentation statistiquement significative des hypertrophies corticales est observée à la fois dans les générations F0 et F1 à la plus forte dose testée. Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.
- **Isofetamid** : des effets sur les surrénales sont retrouvés dans plusieurs études réalisées sur plusieurs espèces. Dans l'étude sur 90 jours, réalisée chez le rat à des doses comprises entre 100 et 10 000 ppm, il est observé une augmentation statistiquement significative du poids absolu et relatif des surrénales (dès 1000 ppm chez les femelles et à la plus forte dose testée dans les deux sexes). Elle est associée à une augmentation statistiquement significative de l'hypertrophie des cellules corticales de la zone fasciculaire chez les femelles à la plus forte dose testée (637-741 mg/kg pc/j). Une augmentation statistiquement significative du poids relatif des surrénales, associée à une augmentation de l'hypertrophie corticale (6/12 femelles) est aussi observée chez les femelles à la plus forte dose testée (1067-1306 mg/kg pc/j) dans l'étude de toxicité orale sur 90 jours chez la souris, réalisée à des doses entre 100 et 8000 ppm. Dans l'étude sur 90 jours chez des chiens exposés par voie orale à des doses comprises entre 100 et 10 000 ppm, une hypertrophie des cellules corticales est rapportée chez 2/4 mâles à la plus forte dose testée (301 mg/kg pc/j). Enfin, des effets similaires sont rapportés dans l'étude long terme chez la souris exposée par voie orale à des doses comprises entre 100 et 4000 ppm, incluant une augmentation statistiquement significative du poids des surrénales chez les mâles, associée à une augmentation non statistiquement significative de l'hypertrophie des cellules corticales (4/51 mâles versus 0/48 chez les contrôles) et de l'hyperplasie focale sous capsulaire (16/51 mâles versus 10/48 chez les contrôles) à la plus forte dose testée (431-502 mg/kg pc/j). Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.
- **Penflufen** : dans l'étude de 90 jours réalisée chez le chien, par voie orale, à des doses comprises entre 180 et 18000 ppm, il est observé une augmentation statistiquement significative du poids absolu des surrénales chez les mâles à la plus forte dose testée (532 mg/kg pc/j). Celle-ci s'accompagne d'une légère hypertrophie/hyperplasie des cellules corticales chez 2/4 mâles (statistique non spécifiée). Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.
- **Penthiopyrad** : des effets sur les surrénales sont retrouvés dans plusieurs études réalisées sur différentes espèces. Dans l'étude de 90 jours chez le chien, réalisée par voie orale à des doses entre 300 et 30 000 ppm, une hypertrophie des cellules corticales est rapportée chez tous les mâles à la plus forte dose testée (811 mg/kg pc/j). Cet effet, associé à une augmentation du poids absolu et relatif des surrénales, est retrouvé chez tous les chiens exposés à la plus forte dose testée (445-461 mg/kg pc/j), dans l'étude sur un an, réalisée par voie orale des doses comprises entre 310 et 15000 ppm. Des effets sur les surrénales sont observés dans une étude de 52 semaines chez le rat, réalisée par voie orale à des doses comprises entre 6,25 et 400 mg/kg pc/j. Les effets (statistiquement significatifs dès 100 mg/kg pc/j) incluent une augmentation du poids relatif des surrénales, une hypertrophie cellulaire dans la zone glomérulaire et une vacuolisation lipidique corticale. Des modifications du contenu en graisse (« fatty change ») (statistiquement significatives), ainsi que des hypertrophies de la zone glomérulaire (non statistiquement significatives), sont observées chez les femelles à la plus forte dose testée dans l'étude de cancérogénicité chez le rat, réalisée par voie orale à des doses comprises entre 9 et 250 mg/kg pc/j. Des effets sur les surrénales sont aussi rapportés dans l'étude de reprotoxicité sur 2 générations chez le rat, réalisée par voie orale à des doses comprises

entre 200 et 5000 ppm. Ils consistent en une augmentation statistiquement significative des hypertrophies corticales (avec augmentation du poids relatif et absolu des surrénales) chez les femelles des générations F0 (à la dose de 439-480 mg/kg pc/j) et F1 (à la dose de 90,5-95,6 mg/kg pc/j). Des hypertrophies corticales sont aussi rapportées chez les mâles mais pas de façon statistiquement significative. Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.

- **Pydiflumetofen** : dans l'étude sur deux générations réalisée chez le rat par voie orale à des doses comprises entre 150 et 4500 ppm, une augmentation du poids des surrénales dans la zone corticale est observée à la plus forte dose testée chez les mâles et les femelles de la génération F0 (276,6 mg/kg pc/j pour les mâles et 290,8 mg/kg pc/j chez les femelles) et chez les mâles de la génération F1 (363,8 mg/kg pc/j). Ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans l'élaboration des VTR.
- **Sedaxane** : dans l'étude de 90 jours chez le rat, réalisée par voie orale à des doses comprises entre 300 et 5000 ppm, une augmentation statistiquement significative du poids relatif des surrénales est notée chez les mâles à la plus forte dose testée (325 mg/kg pc/j). Cet effet n'est pas associé à des effets histopathologiques.

Il n'est pas fait état d'effet sur les surrénales dans le dossier réglementaire pour le **boscalid** et l'**isopyrazam**.

En résumé, concernant les surrénales, des effets (histologiques et/ou sur le poids) sont rapportés pour la majorité des SDHI analysés par le GT. A part pour le cyflumetofen, ces effets apparaissent à des doses supérieures à celles utilisées dans le cadre de l'élaboration des VTR. Néanmoins, la toxicité surrénalienne est à considérer avec attention à travers le prisme du mode d'action de ces molécules. Dans ce sens, bien que cet effet apparaisse comme un événement non significatif, le développement de phéochromocytomes observés en réponse à une exposition au bixafen et au flutolanil est considéré par le GT comme un signal d'alerte, en raison du mécanisme d'action des SDHI (inhibition de la SDH) et de la susceptibilité que confère l'inactivation de la SDH à développer ce type de tumeurs neuroendocrines chez l'humain.

8.4 Effets oculaires

Les mutations de la SDH affectent le développement oculaire (cf. Tableau 53) et des articles récents (Tableau 60) décrivent des effets délétères sur l'œil en lien avec l'exposition à certains SDHI dans des espèces non mammifères. En conséquence, le GT a recensé les observations oculaires rapportées dans les études réglementaires, y compris lorsque celles-ci n'étaient pas statistiquement significatives. En effet, les malformations oculaires sont des événements rares avec une incidence naturelle faible qui sont observées ponctuellement dans diverses études des dossiers réglementaires de plusieurs SDHI. Etant donné leur rareté, il est difficile de trancher sur leur lien ou non avec les traitements. C'est la répétition de ces événements à faible incidence rapportés à travers les divers dossiers réglementaires, associés à la littérature académique et aux effets significatifs observés avec l'isopyrazam qui motivent cette section sur les effets des SDHI dans le système visuel. Enfin, les effets oculaires discutés ici ne concernent pas les irritations mais spécifiquement les atteintes du globe oculaire et de la rétine.

Tableau 60 : Résumé des atteintes oculaires décrites dans les dossiers réglementaires et rapportées dans la littérature pour les 14 SDHI évalués par le GT

SDHI	Dossier réglementaire	Littérature
Benzovindiflupyr	NR	NR
Bixafen	Pâleur rétinienne (étude de cancérologie sur deux ans, rats mâles et femelles)	Microphthalmie, défauts de lamination, dépigmentation de la rétine (xénope et poisson zèbre) (P. Xiao et al. 2021; Wu et al. 2018; Brenet, Hassan-Abdi, et Soussi-Yanicostas 2021)
Boscalid	NR	Défauts de différenciation neuronale (photorécepteurs), déficit visuel, malformations cérébrales (poisson zèbre) (Qian et al. 2021; H. Wang et al. 2020)
Carboxin	NR	NR
Cyflumetofen	Microphthalmie, replis de la rétine (étude toxicité développementale, rat)	NR
Fluopyram	Atrophie rétinienne, dégénérescence du cristallin (étude 2 ans, rat)	NR
Flutolanil	NR	NR
Fluxapyroxad	NR	Microphthalmie, défauts de lamination de la rétine (poisson zèbre) (Qiu et al. 2022)
Isofetamid	NR	NR
Isopyrazam	Microphthalmie, replis rétinien (études développementales, lapin)	Microcéphalie, microphthalmie, dépigmentation oculaire, malformations du cristallin (poisson zèbre et xénope) (Yao, Xu, et al. 2018; Wu et al. 2018)
Penflufen	NR	NR
Penthiopyrad	Microcéphalie, microphthalmie, replis rétinien (études de toxicité développementale, rat et lapin)	NR
Pydiflumetofen	NR	NR

Sedaxane	NR	Microcéphalie (poisson zèbre) (Yao, Yu, et al. 2018)
----------	----	--

N/A : non applicable ; NR : non reporté

8.4.1 Effets oculaires reportés dans les dossiers réglementaires

Il n'est pas fait état d'atteintes oculaires dans le dossier réglementaire pour le benzovindiflupyr, le boscalid, la carboxine, le flutolanil, le fluxapyroxad, l'isofetamid, le penflufen, le pydiflumetofen et le sedaxane. Pour les autres SDHI, les effets sont décrits ci-dessous.

Bixafen : Dans l'étude de cancérogénicité sur 2 ans, les rates traitées présentent une pâleur du fond d'œil dans tous les groupes (contrôle : 3/30; 2,81 mg/kg pc /j : 6/40; 17,4 mg/kg pc/j : 6/33; 117 mg/kg pc/j : 10/40). Cet effet n'est pas dose-relié et ne présente pas de significativité statistique par rapport au groupe contrôle. De plus, il n'y a pas de signes histo-pathologiques au niveau du cristallin et de la rétine. Dans une étude équivalente sur les rats mâles, la présence d'une pâleur rétinienne dans l'examen du fond d'œil est relevée uniquement à la dose la plus forte (80,5 mg/kg pc/j).

Une pâleur rétinienne peut être le signe de plusieurs pathologies : une atrophie optique avec une perte des axones des cellules ganglionnaires qui composent le nerf optique, une rétinite pigmentaire avec un amincissement de la couche des photorécepteurs (les rats étant de souche Wistar, ils sont albinos et donc dépigmentés, une rétine amincie apparaît donc plus pâle et non pas noirâtre comme classiquement dans les rétinites pigmentaires), ou un défaut de vascularisation de la rétine (ischémie) (Chalupa et Williams 2008; R. S. Smith et al. 2001). Cette observation nécessiterait des examens complémentaires pour identifier l'origine de la pâleur (mort des photorécepteurs et/ou des cellules ganglionnaires, ischémie) et définir son lien ou non avec le traitement.

Cyflumetofen : Dans l'étude de toxicité développementale sur le rat, une microphthalmie et des replis rétiens sont rapportés à la dose la plus faible (50 mg/kg pc/j) (cf. points d'attention du cyflumetofen). Il apparaît donc que deux fœtus présentent des malformations oculaires majeures impactant gravement la fonction visuelle.

Fluopyram : Le DAR indique que l'œil est un organe cible du fluopyram, avec l'observation d'une atrophie rétinienne, d'une dégénérescence lenticulaire (atteinte du cristallin) et une atrophie rétinienne périphérique chez la femelle à la dose d'exposition la plus élevée (89 mg/kg pc/j) dans l'étude sur 2 ans chez le rat. L'incidence de ces anomalies ophtalmiques portent sur une diminution des vaisseaux, une pâleur anormale du fond et une hyper-réflexivité de la rétine et sont à relier à celles observées en réponse à d'autres membres de la famille des SDHI (cf bixafen). Elles pourraient constituer un signe caractéristique et aisément analysable pour mettre en évidence des effets neurotoxiques critiques.

Isopyrazam : Les études de toxicité développementale ont mis en évidence des perturbations de l'organogénèse du système visuel, en particulier des microphthalmies chez le lapin (voir points d'attention de l'isopyrazam). Dans une première étude, deux fœtus sur 57 présentent des yeux de taille sensiblement réduite à la concentration la plus élevée (400 mg/kg pc/j) avec, pour l'un d'eux, la présence de replis de la rétine observés lors d'examens microscopiques. Il est à noter qu'un animal sur 43 du groupe contrôle présente également un œil de taille réduite. Des manifestations oculaires sont également mises en évidence dans une deuxième étude à plus forte dose. Ainsi, 2/27 fœtus et 5/32 fœtus présentent des yeux de taille réduite à 600 et 1000 mg/kg pc/j respectivement, alors que 9/27 fœtus, 5/23 fœtus et 10/32 fœtus présentent des yeux légèrement plus petits à 600, 800 et 1000 mg/kg pc/j, respectivement. De plus, des malformations intraoculaires sont retrouvées lors de l'examen microscopique des yeux chez 15/21, 9/16 et 17/29 fœtus à 600, 800 et 1000 mg/kg pc/j, respectivement et seulement chez

1/20 fœtus contrôle. Dans la troisième étude, 5/76 fœtus présentent une malformation oculaire (microphthalmie et anophtalmie) à la dose la plus forte (1000 mg/kg pc/j) contre 1/95 dans les animaux contrôles. Cette étude et notamment les effets oculaires observés ont conduit au classement de la substance comme reprotoxique présumé (1B). Dans la quatrième étude, un seul cas de microphthalmie est observé parmi 72 fœtus à la concentration la plus forte (500 mg/kg pc/j). Ces études suggèrent fortement que l'œil est un organe cible de l'isopyrazam et qu'il y a un effet tératogène du composé sur cette structure.

Penthiopyrad : Dans l'étude de toxicité développementale chez le rat Wistar, 3/108 fœtus présentent une microphthalmie à la concentration testée la plus élevée (1000 mg/kg pc/j) pour 2/127 chez les contrôles. Dans l'étude de toxicité développementale chez le lapin, 4/206 fœtus des animaux traités aux doses les plus faibles (25 mg/kg pc/j) sont nés avec des yeux ouverts suggérant une malformation des paupières lors de l'organogénèse du globe oculaire versus 6/225 fœtus contrôles. Enfin, 1/206 fœtus présente une microphthalmie avec des replis rétinien, associée à une hydrocéphalie à la dose de 25 mg/kg pc/j (cf. points d'attention du penthiopyrad).

En résumé, des effets oculaires sont retrouvés dans les dossiers réglementaires de 5 SDHI. Ces effets sont principalement identifiés dans l'organogénèse oculaire (cyflumetofen, isopyrazam, penthiopyrad) mais d'autres atteintes à l'âge adulte sont également retrouvées (bixafen, fluopyram). Concernant la microphthalmie, celle-ci est liée à la perturbation des signaux développementaux entre, d'une part, les vésicules optiques provenant du diencephale en formation qui donneront la rétine, l'épithélium pigmentaire et le nerf optique et d'autre part l'ectoderme qui donnera la cornée et le cristallin. Ces perturbations conduisent à la formation d'un globe oculaire imparfait de petite taille (microphthalmie), ou absent (anophtalmie) auquel peuvent être associées des malformations du cristallin et de l'iris (colobome) ou de la cornée (kératocône). Des malformations plus larges peuvent également être associées lorsque les perturbations touchent des gènes clés dans l'organogénèse du SNC (système nerveux central) : microcéphalie (tête et cerveau de taille réduite), acéphalie (absence de plusieurs structures céphaliques), hydrocéphalie (cerveau aminci avec de larges ventricules cérébraux) (Cardozo, Sánchez-Bustamante, et Bovolenta 2023).

Le système visuel est une cible pour l'isopyrazam et le fluopyram. Ces effets oculaires sont retrouvés à des doses d'exposition supérieures à celles ayant permis d'établir les VTR actuelles. Pour d'autres SDHI, ces malformations oculaires sont souvent isolées et ne ressortent pas comme significatives lors des tests statistiques menés et ce, même si les contrôles sont exempts de ces malformations. Cependant, l'étude transversale sur les 14 SDHI souligne la répétition de ces événements dans les dossiers réglementaires de plusieurs substances et constitue un point d'attention.

8.4.2 Effets oculaires reportés dans la littérature

Dans la littérature, des effets oculaires sont retrouvés dans des espèces non mammifères pour plusieurs SDHI et sont décrits ci-dessous.

Les traitements au bixafen sur des modèles embryonnaires aquatiques (xénope et poisson zèbre) induisent des microphthalmies, des microcéphalies, des défauts de lamination de la rétine ainsi qu'une dépigmentation rétinienne (P. Xiao et al. 2021; Wu et al. 2018; Brenet, Hassan-Abdi, et Soussi-Yanicostas 2021).

Des effets délétères sur la différenciation des neurones rétinien (photorécepteurs) ainsi qu'une atteinte de l'acuité visuelle sont rapportés avec le boscalid chez le poisson zèbre (Qian et al. 2021; H. Wang et al. 2020).

L'apparition de microphthalmie et des défauts de lamination de la rétine sont associés à l'exposition au fluxapyroxad chez le poisson-zèbre (Yu et al. 2022; Qiu et al. 2022).

Deux études conduites avec l'isopyrazam sur le poisson zèbre et sur le xénope mettent en évidence des malformations oculaires mais également des malformations cérébrales majeures (microcéphalie, acéphalie) (Yao, Xu, et al. 2018; Wu et al. 2018).

Des effets délétères du sedaxane sur l'organogénèse du système nerveux sont rapportés sur poisson zèbre (microcéphalie) (Yao, Yu, et al. 2018).

Ainsi, les données de la littérature scientifique suggèrent un effet tératogène sur le système visuel dans des modèles d'amphibien et de poisson pour 5 des pesticides évalués (bixafen boscalid, fluxapyroxad, isopyrazam, sedaxane).

C'est également le cas pour deux inhibiteurs de la SDH non évalués dans ce rapport et pour lesquels la littérature décrit des malformations oculaires et/ou cérébrales (isoflucypram et triclosan). Pour l'isoflucypram, bien que l'opinion du RAC (RAC, 2022) ne relève pas d'atteinte oculaire, la littérature fait état de microphthalmie et de défauts de lamination de la rétine (X. Chen et al. 2022). Le triclosan n'est pas une substance phytopharmaceutique mais un composé utilisé dans de nombreux produits (textiles, jouets, produits d'hygiène etc) et qui inhibe l'activité du complexe II (Teplova, Belosludtsev, et Kruglov 2017). Dans la littérature, il est fait état de microphthalmie et de défauts de lamination de la rétine (Kim et al. 2018).

Dans ces modèles xénope et poissons zèbres, les modalités et doses d'exposition sont non comparables avec une exposition humaine, cependant elles permettent d'alerter sur des altérations spécifiques et majeures et justifient de conduire des analyses plus détaillées des effets induits par les SDHI, utilisés seuls ou en combinaison, sur le système visuel et le SNC.

Au final, ces éléments d'alerte imposent de progresser dans la caractérisation des effets des SDHI sur le système visuel et en particulier sur leur mécanisme d'action qui est, pour l'instant, largement inconnu.

Plusieurs hypothèses peuvent cependant être évoquées pour expliquer les atteintes observées au cours du développement et à l'âge adulte :

- les SDHI altérant l'homéostasie lipidique, une perturbation du cholestérol pourrait être évoquée. Or ce stérol est essentiel à l'activité de la protéine « sonic hedgehog » (shh), un des facteurs clef dans l'organogénèse du tissu nerveux dont une perturbation conduit à des malformations majeures : holoproencéphalie, microphthalmie et anophthalmie (Cavodeassi, Creuzet, et Etchevers 2019) ;
- la rétine est sensible aux perturbations de la respiration mitochondriale et des pathologies spécifiques sont associées à des mutations de la chaîne respiratoire comme dans la neuropathie optique congénitale de Leber (Howell 1998). Les SDHI pourraient donc spécifiquement affecter des neurones rétinien plus sensibles à une atteinte mitochondriale tels que les cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique ;
- enfin il a été démontré que la rétine est un tissu dans lequel la voie du succinate est majoritaire, avec un important trafic de ce composé dans les différents compartiments rétinien (Bisbach et al. 2020; Hass et al. 2022) suggérant que ce tissu serait particulièrement sensible aux inhibiteurs de la SDH.

Une atteinte du système visuel, en particulier de la rétine, est observée pour plusieurs SDHI, de façon significative pour l'isopyrazam (à des doses d'exposition supérieures à celles ayant permis d'établir les VTR actuelles) ou ponctuellement pour d'autres composés et sans significativité statistique (bixafen, cyflumetofen, fluopyram, penhiopyrad). La majorité des atteintes est retrouvée dans les études de toxicité développementale. Il s'agit principalement de microphthalmies et de replis rétinien. Des atteintes ponctuelles sont également mises en évidence à l'âge adulte (pâleur du fond de l'œil), suggérant une sensibilité du système visuel tout au long de la vie. Ceci constitue un signal qui nécessiterait des investigations supplémentaires, notamment de la taille des globes oculaires, ainsi qu'une étude de

neurotoxicité du développement, pour clarifier la pertinence de ces effets (cf. recommandations).

8.5 Effets neurologiques

Les effets neurologiques des SDHI décrits dans les dossiers réglementaires ont été examinés notamment à la lueur des connaissances sur les effets des SDHI non pesticides (3-NP, malonate et TTFA). Ces substances montrent un effet néfaste sur le striatum ou/et la substance noire chez les rongeurs et les primates, associé à leur mode d'action ciblant le complexe II mitochondrial.

Ces manifestations sont le plus souvent été observées chez le rat, dans des études de neurotoxicité aiguë ou après exposition répétée pendant 90 jours.

8.5.1 VTR et effets critiques neurologiques observés dans les études réglementaires

Les effets critiques utilisés pour la détermination des VTR reposent, pour 4 des 14 SDHI examinés, sur des manifestations neurologiques : le benzovindiflupyr, le fluopyram, le penflufen et le sedaxane (Tableau 61 et chapitre 6).

Pour ces 4 substances, la détermination des ARfD repose sur des études de neurotoxicité aiguë chez le rat. Les effets observés, généralement représentés par une diminution de l'activité locomotrice, restent très transitoires et essentiellement observés le jour de l'exposition. Dans le seul cas du sedaxane, l'AOEL a été établie sur la base d'une diminution de la force dans une étude de toxicité subchronique chez le rat exposé pendant 90 jours.

Benzovindiflupyr : l'étude de neurotoxicité aiguë chez le rat montre une diminution de la force d'agrippement (« grip test ») et de l'activité motrice, ainsi qu'une diminution du gain de poids et de la température corporelle, suite à une exposition à 30 ou 80 mg/kg pc/j chez les femelles et mâles, respectivement. Ces effets sont observés le jour de l'exposition et sont réduits après une semaine. Ces effets sont absents à la dose de 10 mg/kg pc.

Fluopyram : une étude de neurotoxicité aiguë chez le rat rapporte une diminution de l'activité motrice et locomotrice à 100 mg/kg pc. Cet effet est absent à la dose de 50 mg/kg pc. Cependant les tests ont été réalisés seulement le jour de l'exposition, sans que les effets à 7 et 14 jours n'aient été explorés. Une expérience initiale avait été réalisée dans laquelle les tests ont été effectués 1 heure, 7 jours et 14 jours après l'exposition à 0, 125, 500 ou 2000 mg/kg pc. Une réduction d'activité locomotrice et une température corporelle abaissée sont observées le jour du traitement à 500 mg/kg pc chez les mâles, alors qu'une réduction d'activité motrice et locomotrice est également observée dès la dose la plus faible de 125 mg/kg pc chez les femelles.

Penflufen : une étude de neurotoxicité aiguë chez le rat montre une atteinte locomotrice dès 100 mg/kg pc pour les femelles ou 500 mg/kg pc/j chez les mâles, une ataxie, une raideur des membres postérieurs et une réduction de l'activité à 500 mg/kg pc/j chez les femelles. Ces effets disparaissent dans les 3 jours. Dans une seconde étude chez le rat femelle exposé à 25 ou 50 mg/kg pc, aucun effet n'est observé à 50 mg/kg pc mais ces animaux ont été sacrifiés un ou deux jours après le traitement, en l'absence de tests fonctionnels et d'examen nécropsique.

Sedaxane : une étude de neurotoxicité aiguë, utilisée dans la détermination de l'ARfD, montre une diminution d'activité locomotrice et du nombre de redressements à des doses égales ou supérieure à 250 mg/kg pc, le jour de l'exposition. Une étude de toxicité pendant 90 jours chez

le rat, utilisée dans la détermination de l'AOEL, montre une diminution de la force (« fore grip strength »), dès la dose de 2000 ppm (soit 168-186 mg/kg pc/j).

Tableau 61: Effets critiques neurologiques des SDHI utilisés dans la détermination de VTR

SDHI	VTR	Etude clé	Effets neurologiques
Benzovindiflupyr	ARfD	Neurotoxicité aiguë – Rat	Diminution de la force d'agrippement (« grip test »), de l'activité motrice, du gain de poids et de la température corporelle suite à une exposition à 30 ou 80 mg/kg pc chez les femelles et mâles, respectivement. Ces effets sont observés essentiellement le jour de l'exposition et absents à 10 mg/kg pc.
Fluopyram	ARfD	Neurotoxicité aiguë – Rat	Diminution de l'activité motrice et locomotrice le jour de l'exposition à 100 mg/kg pc (NOAEL de 50 mg/kg pc).
Penflufen	ARfD	Neurotoxicité aiguë – Rat	Atteinte locomotrice dès 100 mg/kg pc pour les femelles ou 500 mg/kg pc chez les mâles, ataxie, raideur des membres postérieurs et réduction de l'activité à 500 mg/kg pc chez les femelles. Ces effets disparaissent dans les 3 jours. Dans une seconde étude chez le rat femelle exposé à 25 ou 50 mg/kg pc, aucun effet observé à 50 mg/kg pc mais ces animaux ont été sacrifiés un ou deux jours après le traitement, en l'absence de tests fonctionnels et d'examen nécropsique.
Sedaxane	ARfD	Neurotoxicité aiguë – Rat	Réduction de l'activité locomotrice et du nombre de redressements à ≥ 250 mg/kg pc le jour de l'exposition
	AOEL	Rat - 90 jours	Diminution de la force (« fore grip strength »), à la dose 2000 ppm (soit 168-186 mg/kg pc/j)

8.5.2 Effets neurologiques observés dans les études réglementaires à des doses supérieures à celles utilisées pour les VTR

Des manifestations neurologiques sont observées avec d'autres SDHI à des doses plus élevées que celles utilisées dans la détermination de VTR (Tableau 62).

Etudes de neurotoxicité aiguë chez le rat

Des études de neurotoxicité aiguë chez le rat sont disponibles pour 12 des 14 SDHI étudiés (aucune étude n'est disponible pour le bixafen et la carboxine). Trois de ces SDHI n'induisent pas de signe de neurotoxicité (boscalid, cyflumetofen, isofetamid). Pour 4 substances, des signes neurologiques sont utilisés dans l'établissement des ARfD. Des signes neurologiques sont rapportés à des doses supérieures à celles utilisées pour les VTR pour 5 autres substances.

Flutolanil : dans une étude de neurotoxicité aiguë, le flutolanil a été administré chez le rat à des doses uniques de 125, 500 et 2000 mg/kg pc. Cette administration a été suivie d'une

période d'observation de 14 jours. Aucun des signes cliniques couverts par la « *Functional Observational Battery* » (FOB) n'a été constaté, ainsi qu'aucune modification du poids corporel, de la consommation alimentaire, de l'activité locomotrice, du poids des organes et des examens anatomopathologiques des divers organes.

Fluxapyroxad : une étude de neurotoxicité aiguë a été menée chez le rat aux doses de 0, 125, 500 et 2000 mg/kg pc. L'exposition aiguë montre une NOAEL de 125 mg/kg pc au-delà de laquelle (≥ 500 mg/kg pc) des effets comportementaux mineurs et transitoires (augmentation du nombre de redressements chez les mâles, diminution de l'activité motrice) ont été observés le jour de l'exposition.

Isopyrazam : dans une étude de neurotoxicité aiguë (0, 30, 250 et 2000 mg/kg pc) par gavage, l'évaluation européenne conclue à l'absence d'effet neurotoxique alors que des modifications ont été mises en évidence aux deux doses les plus fortes uniquement au premier jour de l'observation, avec une diminution de la distance totale parcourue, du temps passé en zone centrale (pouvant refléter une anxiété) et du nombre de redressements. L'évaluation européenne argue du fait qu'il s'agit d'effets relevant d'une toxicité générale et ne sont pas spécifiques d'un effet neurotoxique pour retenir une NOAEL à 2000 mg/kg pc pour la neurotoxicité.

Penthiopyrad : une étude de neurotoxicité aiguë a été menée chez le rat aux doses de 0, 125, 500 et 2000 mg/kg pc. L'exposition aiguë conduit à une NOAEL de 125 mg/kg pc chez le rat, au-delà de laquelle (≥ 500 mg/kg pc) des effets transitoires (posture voûtée, démarche instable, évasement des pieds à l'atterrissage, motricité réduite, température corporelle réduite) sont observés le jour de l'exposition.

Pydiflumetofen : deux études de neurotoxicité aiguë ont été menées chez le rat : l'une chez les mâles (M) et les femelles (F) aux doses de 0, 100(F)/300(M), 1000 et 2000 mg/kg pc et l'autre uniquement chez les femelles aux doses de 0, 100, 300 et 1000 mg/kg pc. Elles montrent une absence d'effets jusqu'à 2000 mg/kg pc chez le rat mâle mais montrent des signes cliniques (piloérection, posture voûtée, démarche anormale, température corporelle réduite) et une diminution d'activité motrice et du nombre de redressements à 1000, voire dès 100 mg/kg pc chez les femelles le jour de l'exposition.

Effets neurologiques chez le rat exposé par voie orale pendant 90 jours

Parmi les 14 SA étudiées, 10 d'entre elles n'ont induit aucun signe clinique suggérant une neurotoxicité dans les études de neurotoxicité sub-chronique chez le rat exposé pendant 90 jours. Outre l'étude réalisée avec le sedaxane utilisée dans la détermination de l'AOEL, des signes neurologiques sont rapportés dans ces études pour 3 autres SDHI.

Cyflumetofen : une étude de 90 jours chez le rat, menée à 0, 100, 300, 1000 et 3000 mg/kg de nourriture montre une augmentation d'activité motrice à 1000 mg/kg de nourriture (54,5 - 62,8 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement) et une diminution de la force d'agrippement à 300 mg/kg de nourriture (16,5 mg/kg pc/j) chez les mâles.

Flutolanil : dans une étude de neurotoxicité chez le rat exposé à des concentrations à 0, 62,6, 250 et 1000 mg/kg pc/j pendant 13 semaines, des observations isolées et sans aucune relation dose-effets ont été rapportées, telles qu'une diminution du nombre de redressements, une moindre force d'agrippement des membres postérieurs et une diminution de la température rectale.

Isopyrazam : dans une étude de neurotoxicité chez le rat exposé à des doses de 20-25, 98-114, 382-468 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement pendant 90 jours, des modifications de l'activité locomotrice ont été mises en évidence à la dose la plus forte, avec une distance totale réduite pour les femelles et un nombre de redressements diminué pour les mâles et les femelles. Cependant l'évaluation européenne considère ces changements comme relevant de la toxicité générale et non pas spécifiquement d'une neurotoxicité. Les

analyses macro et microscopiques des cerveaux n'ont pas mis en évidence d'effet lié au traitement. La NOAEL a été établie à 382-468 mg/kg pc/j pour les mâles et femelles respectivement pour la neurotoxicité.

Tableau 62 : Effets neurologiques des SDHI non impliqués dans la détermination des VTR d'après les études court ou long terme chez les rongeurs et/ou le chien

SDHI	Etude clé	Effets neurologiques
Benzovindiflupyr	Neurotoxicité - Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité (locomotion, force d'agrippement) jusqu'à 51-38 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Bixafen	Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité (activité motrice, réflexes sensoriels, force d'agrippement) jusqu'à 130-153 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Boscalid	Neurotoxicité aiguë - Rat	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 2000 mg/kg pc
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 1050-1273 mg/kg pc/j chez les mâles et les femelles respectivement
Carboxin	Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 16,1 - 37 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Cyflumetofen	Neurotoxicité aiguë - Rat	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 2000 mg/kg pc
	Rat - 90 jours	Augmentation d'activité motrice à 54,5 - 62,8 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement et diminution de la force d'agrippement à 16,5 mg/kg pc/j chez les mâles
	Rat - 28 jours	Pour le métabolite B3, diminution du poids relatif du cerveau, de la capacité exploratoire chez les mâles et des capacités d'agrippement chez les mâles et les femelles exposés à 85,3 - 88,2 mg/kg pc/j respectivement
Fluopyram	Neurotoxicité - Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 164-197 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Flutolanil	Neurotoxicité aiguë - Rat	Après exposition à 0, 125, 500 et 2000 mg/kg pc, un nombre diminué de redressements a été observé chez les mâles au septième jour et à la dose de 125 mg/kg pc puis une tendance à l'augmentation du nombre de redressements au quatorzième jour chez les animaux traités à la dose de 2000 mg/kg pc, non considérés liés au traitement dans le dossier réglementaire
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Chez le rat exposé jusqu'à 1000 mg/kg/j, des observations isolées et sans aucune relation dose-effets ont été rapportées, telles qu'une diminution du nombre de redressements, une moindre force d'agrippement des membres postérieurs et une diminution de la température rectale

Fluxapyroxad	Neurotoxicité aiguë - Rat	NOAEL de 125 mg/kg pc au-delà de laquelle (≥ 500 mg/kg pc) des effets comportementaux mineurs et transitoires (augmentation du nombre de redressements chez les mâles, diminution d'activité motrice) sont observés le jour de l'exposition
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 302-338 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Isofetamid	Neurotoxicité aiguë - Rat	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 2000 mg/kg pc
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 1049-1213 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Isopyrazam	Neurotoxicité aiguë - Rat	Modifications aux deux doses les plus fortes (250 et 2000 mg/kg pc) uniquement au premier jour après l'exposition, avec diminution de la distance totale parcourue, du temps passé en zone centrale (pouvant refléter une anxiété) et du nombre de redressements
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Modifications à la dose la plus forte (382-468 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement) considérées comme relevant d'une toxicité générale, avec diminution de la distance totale parcourue pour les femelles et du nombre de redressements pour les mâles et les femelles. Les analyses macro et microscopiques des cerveaux ne mettent pas en évidence d'effets du traitement
	Rat - 2 ans	La force musculaire des membres postérieurs est significativement réduite chez les femelles exposées à la dose la plus forte (233 mg/kg pc/j) en semaine 50, les auteurs avancent l'absence de signes histopathologiques et d'autres observations similaires dans d'autres études de toxicité chronique pour suggérer qu'il s'agit d'un évènement aléatoire sans lien avec le traitement
	Chien - 90 jours	Dans une étude par gavage chez le chien (0, 30, 100, 300 mg/kg pc/j), des tremblements et des mouvements incontrôlés de la tête ainsi que des problèmes d'équilibre sont rapportés à la dose de 300 mg/kg pc/j sur 3 des 4 mâles et de 100 mg/kg pc/j sur 1 des 4 mâles. Dans cette étude la NOAEL est établie à 30 mg/kg pc/j. Dans une deuxième étude chez le chien (0, 10, 30, 250 mg/kg pc/j), des tremblements similaires mais persistants associés à d'autres signes cliniques (comportement anormal, flexion des membres postérieurs, sédation, mouvements non coordonnés, ptosis) ont été observés chez 1 des 4 mâles de l'étude à la dose la plus forte de 250 mg/kg pc/j ainsi qu'une activité locomotrice réduite chez un autre à la même dose.
Penflufen	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 516-609 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Penthiopyrad	Neurotoxicité aiguë - Rat	Modifications transitoires à ≥ 500 mg/kg pc (posture voûtée, démarche instable, évasement des pieds à l'atterrissage,

		motricité réduite, température corporelle réduite) uniquement le jour de l'exposition
	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 640 mg/kg pc/j
	Neurotoxicité du développement - Rat	Effets transitoires chez les descendants de mères exposées à 250 et 500 mg/kg pc (tremblements à 500 mg/kg pc/j et augmentation d'activité motrice à 250 et 500 mg/kg pc/j), sans altérations neuropathologiques
Pydiflumetofen	Neurotoxicité aiguë - Rat	Modifications à 1000, voire à 100 mg/kg pc chez les femelles le jour de l'exposition (piloérection, posture voûtée, démarche anormale, température corporelle réduite) et diminution d'activité motrice et du nombre de redressements
	Rat - 90 jours	Aucun signe de neurotoxicité jusqu'à 1000 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles respectivement
Sedaxane	Neurotoxicité Rat - 90 jours	Diminution transitoire d'activité locomotrice à la dose la plus élevée étudiée de 260 mg/kg pc/j chez les mâles

8.5.3 Analyse des conclusions établies par l'EFSA

De façon générale, dans les dossiers réglementaires, la neurotoxicité des SDHI ne fait pas l'objet d'investigations spécifiques et approfondies au regard de l'hypothèse d'une neurotoxicité chronique qui pourrait résulter d'une atteinte mitochondriale. Un tel lien possible entre neurotoxicité chronique et une atteinte mitochondriale a, par exemple, été largement étayé dans le cas du complexe I mitochondrial dont l'atteinte est impliquée dans la maladie de Parkinson (Terron et al. 2018; EFSA et al. 2017). Concernant les SDHI, cette absence d'études spécifiques dans les dossiers réglementaires est explicitement liée à l'absence d'impératifs réglementaires portant sur la famille chimique de ces pesticides et à sa neurotoxicité potentielle, contrairement par exemple aux substances de la famille des organophosphorés. Certains dossiers concluent cependant à l'absence de preuves de neurotoxicité (bixafen, boscalid, carboxin, isofetamid) dans les études par exposition aiguë ou sub-chronique. De nombreux dossiers font état de signes cliniques d'ordre neurologique, notamment suite à une exposition aiguë à forte dose (benzovindiflupyr, cyflumetofen, fluopyram, flutolanil, fluxapyroxad, isopyrazam, penflufen, penthiopyrad, pydiflumetofen, sedaxane), qui peuvent concerner fréquemment des modifications de l'activité motrice, de la force d'agrippement ou du nombre de redressements. Ces signes cliniques sont généralement transitoires, en particulier observés le jour de l'exposition dans les protocoles d'étude de la neurotoxicité aiguë, et sont ainsi souvent associés à une toxicité systémique. Globalement ces signes restent cependant peu informatifs et ne permettent pas de définir leur origine précise (signes généraux ? signes neurologiques ou musculaires ? ...). Il est aussi rare que des éléments fonctionnels précis soient fournis sur des protocoles d'exposition chronique (90 jours à 2 ans) et, aucun dossier réglementaire ne fait état d'investigations neuropathologiques appropriées au regard de pathologies humaines spécifiques liées à un déficit mitochondrial, n'étant pas requises dans le cadre réglementaire actuel, en particulier dans les protocoles d'exposition subchronique (90 jours) ou chronique (2 ans).

Comme l'indiquent les travaux expérimentaux d'exposition de rongeurs ou de primates à des SDHI non pesticides (3-NP, malonate), un effet néfaste théoriquement plausible de l'exposition aux fongicides SDHI pourrait être représenté par une atteinte nigro-striée, telle que présente dans la maladie de Parkinson et les maladies apparentées (cf. 7.2). Il doit être souligné que

les signes cliniques moteurs caractéristiques de ces maladies ne surviennent que lorsque les niveaux de dopamine striatale sont réduits d'environ 80 %, correspondant à une perte neuronale dopaminergique d'environ 50-70 %. Chez l'humain, les signes cliniques caractéristiques, moteurs (akinésie, hypertonie, tremblement au repos), sont toutefois très fréquemment précédés, des années avant, par d'autres signes cliniques (déficits olfactifs, troubles du transit intestinal, troubles du sommeil paradoxal), plus ou moins spécifiques mais parfois très prédictifs. Ainsi, la seule réalisation de tests fonctionnels dans les études réglementaires, fondés principalement sur l'évaluation du comportement, de l'activité générale et locomotrice, ne permettrait d'identifier que des atteintes majeures et tardives, en l'absence d'investigations neuropathologiques approfondies.

Il est à noter que la ligne directrice 424 de l'OCDE concernant les études de neurotoxicité souligne que les changements de comportement ne sont pas tous spécifiques du système nerveux, et que si des changements sont observés, ils doivent être évalués par rapport à des données histopathologiques, hématologiques ou biochimiques et à des résultats d'autres études de toxicité systémique. Elle précise que comme il est impossible de construire un seul ensemble d'essais permettant de faire une évaluation approfondie du potentiel neurotoxique de toutes les substances, il peut être nécessaire de mettre en oeuvre d'autres essais *in vivo* ou *in vitro* qui sont adaptés au type spécifique de neurotoxicité observé ou escompté.

A l'image de l'expertise conduite par l'EFSA concernant les liens entre complexe I mitochondrial ou stress oxydatif et parkinsonisme (Terron et al. 2018; EFSA et al. 2017), l'identification d'une neurotoxicité chronique de cette nature nécessiterait, non seulement des études fonctionnelles (tests appropriés de motricité en particulier) mais aussi des investigations neuropathologiques dédiées permettant d'évaluer, dans la substance noire et le striatum, la mort neuronale, en particulier des neurones dopaminergiques tyrosine hydroxylase positifs, le statut neurochimique (dopamine et ses métabolites), la présence de signes d'agrégation de la protéine alpha-synucléine, centrale dans ces pathologies, et la neuroinflammation. Par ailleurs, une évaluation des dangers devrait prendre en compte la littérature concernant la neurotoxicité subchronique du TTFA (Ahn et al. 2021).

En résumé, les dossiers réglementaires des SDHI mettent en évidence des troubles neurologiques comportementaux ou moteurs, le plus souvent transitoires et dans des protocoles d'exposition courts. Les études d'exposition sub-chronique ou chronique chez la souris ou le rat ne comportent pas d'études approfondies au regard d'une éventuelle neurotoxicité chronique, qui nécessiteraient non seulement la recherche de déficits comportementaux et moteurs, mais également des investigations neuropathologiques spécifiques. Celles-ci devraient en particulier être de nature à identifier une éventuelle atteinte du système nerveux dopaminergique, atteint de façon ciblée par plusieurs substances chimiques inhibitrices de la SDH.

8.6 Effets rénaux

Plusieurs SDHI sont capables d'induire des néphropathies lors d'exposition de modèles animaux par voie alimentaire. La toxicité rénale représente l'effet critique dans l'élaboration des VTR actuelles pour 2 substances (carboxine, fluopyram). De plus, le GT a considéré cet effet pour remettre à jour la DJA du penthiopyrad.

Benzodiflupyr : la substance administrée pendant 28 jours chez la souris cause à la forte dose (500 ppm, 78 mg/kg pc/j) une néphrite tubulo-interstitielle chez les mâles (2/5 animaux touchés) et 1 femelle sur 5. Cela est caractérisé par une basophilie tubulaire et une infiltration de cellules inflammatoires. Chez les mâles, il est également noté une dilatation minimale des tubules, non observée chez la femelle. De telles altérations rénales n'ont pas été observées

dans l'étude chez la souris sur 90 jours, mais la dose de 500 ppm a dû être abandonnée en raison d'une trop forte toxicité.

Boscalid : dans les deux études à long-terme (2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris), des incidences élevées de néphropathies chroniques sont observées chez les mâles et les femelles dans tous les groupes testés, y compris les groupes témoins. Ces incidences ne montrent aucune tendance dose-reliée. Les niveaux très élevés de ces altérations rénales posent question quant aux conditions d'élevage et à la conduite expérimentale de ces études. Chez les rats femelles, une baisse du poids absolu des reins aux doses de 500 et 2500 ppm (30 et 156 mg/kg pc/j) est associée à la présence et à la sévérité de néphropathies glomérulaires chroniques. Cet effet est considéré comme non lié à la substance en raison de la baisse de poids corporel observée à ces doses.

Carboxine : La toxicité rénale de la carboxine est reconnue et a conduit au classement de la substance dans la classe de danger STOT RE2 ; H373 : Risque présumé d'effets graves pour les organes (reins) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée. Dans le dossier réglementaire, trois études chez le rat (une étude de 28 jours²⁹ et 2 études de 90 jours³⁰) révèlent des atteintes rénales importantes : augmentation du poids, lésions tubulaires, kystes rénaux, néphrite chronique et néphropathie progressive. Les mâles sont plus sensibles à ces effets que les femelles. Ces lésions constituent un facteur majeur de mort prématurée. Une ostéodystrophie fibreuse au niveau du fémur, qui pourrait être reliée à la défaillance rénale de la régulation minérale a été décrite par l'Etat-membre rapporteur. Des effets ont également été observés chez le chien et la souris à des doses supérieures aux doses néphrotoxiques chez le rat. L'étude d'exposition répétée (6h/jour pendant 28 jours) de rats par voie cutanée montre une néphrotoxicité (dégénération/régénération tubulaire) à partir de 400 mg/kg pc/j uniquement chez les mâles.

Cyflumetofen : il n'a pas été rapporté d'effets néphrotoxiques avec le cyflumetofen. Une étude de 28 jours d'exposition alimentaire chez le rat a été conduite avec le métabolite B-3. Chez les mâles, il a été observé des altérations rénales, avec des signes macro et histopathologiques de dégénération/régénération tubulaire et des casts granulaires, dès la plus faible dose testée (75 ppm, équivalent à 6 mg/kg pc/j). Il y a également une accumulation de gouttelettes éosinophiliques (autrement nommée gouttelettes hyalines dans la littérature) au niveau des convolutions des tubules proximaux, observée également dans les animaux témoins. La présence de ces gouttelettes hyalines dans les groupes témoins et traités questionne le fait que les atteintes rénales soient les conséquences de l'accumulation de ces gouttelettes hyalines. De plus, les analyses d'urine montrent la présence d'hématurie chez les mâles exposés à 300 et 1200 ppm (24 mg/kg pc/j et 85 mg/kg pc/j), ainsi que la présence de cellules épithéliales, granuleuses et des casts de cellules épithéliales dans les urines de tous les animaux exposés. Le pH urinaire est également plus bas dans les groupes exposés à 300 ppm et le volume d'urine est plus important dans les animaux traités à la plus forte dose. Les effets rénaux observés sont liés à l'exposition à la substance mais ne sont observés que chez les rats mâles.

Fluopyram : des altérations rénales sont décrites dans plusieurs études. Dans l'étude court-terme sur 28 jours chez le rat, il est noté une augmentation du poids rénal, ainsi que des gouttelettes hyalines au niveau tubulaire proximal et des casts granulaires au niveau de la médulla, dès 31 mg/kg pc/j chez les mâles. Des observations similaires sont faites dans l'étude sur 90 jours chez le rat, chez les mâles, avec une incidence de casts cellulaires dans les urines dose reliée dans tous les groupes traités (de 3,05 à 204 mg/kg pc/j) et une augmentation du poids absolu et relatif des reins et de l'incidence de néphropathies avec gouttelettes hyalines

²⁹ Effets à partir de 90 mg/kg pc/j pour les mâles, 270 mg/kg pc/j pour les femelles.

³⁰ Dans la 1^{ère} étude : effets à 200 ppm (~10 mg/kg pc/j) pour les mâles et à 800 ppm pour les femelles. Dans la 2^{ème} étude : 7/9 animaux avec des néphropathies progressives à 10,5 mg/kg pc/j pour les mâles et 1/10 à la dose de 37 mg/kg pc/j pour les femelles.

à partir de 60,5 mg/kg pc/j. Un mois après l'arrêt de l'exposition, les effets rénaux sont partiellement diminués chez les mâles à la plus forte dose.

Les études long-terme chez la souris et le rat confirment les altérations rénales induites par l'exposition au fluopyram. Dans l'étude de 2 ans chez le rat, il est noté, chez les mâles, une augmentation dose reliée de l'incidence de casts cellulaires dans les urines pendant les 6 premiers mois d'exposition. Cet effet est temporaire, les casts cellulaire n'étant plus observés à 18 et 24 mois. Chez les femelles, les urines ont une couleur orange à rouge à la plus forte dose testée de 89 mg/kg pc/j. Au bout des 2 ans d'exposition, une néphropathie chronique est caractérisée, avec également une dilatation tubulaire, une accumulation de pigments or ou bruns au niveau tubulaire (essentiellement chez les femelles) et une hyperplasie des canaux collecteurs à la plus forte dose testée (29 mg/kg pc/j pour les mâles, 89 mg/kg pc/j pour les femelles). Chez les mâles, des gouttelettes hyalines au niveau tubulaire et des calculs rénaux sont également observés. Dans l'étude sur 18 mois chez la souris, une diminution du poids rénal est observée chez les deux sexes à la forte dose (750 ppm équivalent à 105 mg/kg pc/j pour les mâles et 129 mg/kg pc/j pour les femelles) mais qui n'est associée à l'observation de lésions que chez les femelles.

Enfin, dans l'étude de reprotoxicité sur 2 générations chez le rat, il est rapporté une néphrotoxicité parentale (P et F1) chez les mâles à la forte dose (83,1 mg/kg pc/j). Une augmentation du poids absolu et relatif du rein, associée à une augmentation de l'incidence d'une néphropathie liée à des gouttelettes protéiques est observée. Au niveau biochimique, une augmentation de la créatininémie, de l'urémie et une protéinurie sont observés.

Flutolanil : la substance administrée à des rats pendant 2 ans conduit à une augmentation de néphrose, chez les mâles et les femelles. Elle est observable dès la plus faible dose (équivalent à 1,8 et 2,1 mg/kg pc/j chez les mâles et femelles, respectivement). Elle est statistiquement significative uniquement à l'analyse intérimaire de 12 mois. Un taux élevé de cette maladie est également présent dans le groupe témoin en fin d'étude (16 animaux sur 21 chez les mâles).

Dans une étude à 28 jours chez le rat, le métabolite M-101 a montré des effets rénaux (décrits comme des néphropathies avec α 2u-globuline) chez les mâles à la dose de 4,2 mg/kg pc/j. Ils ont été considérés non pertinents pour l'humain dans le dossier réglementaire.

Isofetamid : des effets rénaux sont rapportés dans les études sur un an et deux ans chez le rat. A la plus forte dose testée chez les rats mâles (5000 ppm soit 237 mg/kg pc/j) dans l'étude sur 1 an, il est noté des altérations basophiliques au niveau tubulaire, dont la signification histopathologique est difficile à saisir. En raison d'une incidence élevée de néphropathie chronique dans les groupes témoins (31 animaux sur 51 chez les mâles) de l'étude sur 2 ans, il n'est pas possible de conclure sur les résultats de cette étude.

Isopyrazam : des altérations rénales de type α 2u-globuline sont prédites pour le métabolite CSCD459488 selon la méthode QSAR. Aucune étude plus poussée n'a été conduite pour vérifier ce point sur des expositions à long-terme.

Penflufen : dans une 1^{ère} étude de 90 jours chez le rat, une augmentation des gouttelettes hyalines au niveau tubulaire est observé chez les mâles à partir de 457 mg/kg pc/j. Dans une 2^{ème} étude de 90 jours chez le rat, les mêmes effets sont décrits chez les rats mâles à une dose plus faible de 228 mg/kg pc/j. La pertinence de ces observations pour l'humain est considérée comme douteuse dans le dossier réglementaire.

Penthiopyrad : des effets rénaux observés dans l'étude chez le rat sur 2 ans chez les mâles (pyérites et signes de néphropathie chronique) ont conduit le GT à prendre en compte ces effets pour établir la DJA sur la base d'une LOAEL à 9 mg/kg pc/j (cf. section 6.12.2.2).

Bixafen, fluxapyroxad, isopyrazam, penflufen, pydiflumetofen, sedaxane : aucun effet rénal néfaste n'est rapporté.

Le rein est le 2^{ème} organe à avoir la plus forte densité en mitochondries et est fortement irrigué. Leur métabolisme doit répondre à une forte demande énergétique impliquant une forte phosphorylation oxydative, de la beta-oxydation des acides gras et une utilisation mineure de glucose et majoritaire de glutamine. Elles sont sensibles à l'hypoxie. Au niveau des tubules contournés distaux (médulla), cette zone faiblement vascularisée engendre un métabolisme glycolytique quasi anaérobie, avec une expression constitutionnelle de HIF1, et une résistance relative à l'hypoxie (Girard 2013).

Enfin, la littérature met en évidence des néphropathies liées à des atteintes de la SDH et des mitochondries et de l'accumulation de succinate (Cardaci et al. 2015; Yang Yang et al. 2016; Le Qian et al. 2019; Tang et al. 2021).

En résumé, les dossiers réglementaires du benzovindiflupyr, du boscalid, de la carboxine, du cyflumetofen pour son métabolite B-3, du fluopyram, du flutolanil, de l'isofetamid et du penthiopyrad indiquent des atteintes rénales à des degrés variables. A l'exception de la carboxine, ces effets rénaux n'ont pas été considérés pertinents pour l'humain sur la base de l'observation d'une accumulation d' α 2u-globuline chez le rat mâle. Pour autant, certains effets sont observés dans d'autres espèces (souris et pour la carboxine, chien) et dans les deux sexes.

8.7 Toxicité sur les organes reproducteurs, la reproduction et le développement

Des effets sur les organes reproducteurs, la reproduction et le développement ont été rapportés dans plusieurs dossiers réglementaires des SDHI et décrits ci-dessous. Seuls les effets pris en compte pour l'élaboration de l'une des VTR sont recensés ici.

Benzovindiflupyr : une étude sur deux générations ayant servi à établir l'AOEL, proposée par le GT, a montré qu'à la dose de 100 ppm soit 6,8 mg/kg pc/j, les mâles de la génération parentale P présentent une diminution significative de la mobilité progressive ainsi qu'une augmentation de la mobilité stationnaire ou non progressive des spermatozoïdes. Même si cet effet n'est pas retrouvé à la dose supérieure (600 ppm), la substance induit des altérations de la morphologie spermatique. Cependant, ces effets n'entraînent pas de modification des capacités reproductives et ne sont pas observés sur la génération F1. Chez les femelles de la génération parentale P ainsi que de la génération F1, une augmentation de l'incidence du diestrus lactationnel a été constatée.

Bixafen : une étude de toxicité prénatale chez le rat montre une diminution du poids fœtal à la dose de 75 mg/kg pc/j, cet effet critique ayant servi à établir l'ARfD.

Cyflumetofen : l'étude sur deux générations, ayant servi à établir l'AOEL et la DJA proposées par le GT, a montré chez les femelles de la génération F1 une vacuolisation des cellules interstitielles ovariennes à une dose supérieure à la dose critique (NOAEL = 10 mg/kg pc/j) et sans entraîner de modification des capacités reproductives. De plus, à des doses supérieures à la dose critique, il a été observé un retard de maturation sexuelle (séparation préputiale, ouverture vaginale) dans les deux sexes de la génération F1.

Flutolanil : des études de toxicité prénatale chez le lapin ont montré une augmentation des résorptions et de mortalité foetale à la dose de 200 mg/kg pc/j, cet effet critique ayant servi à établir l'ARfD.

Fluxapyroxad : une augmentation des pertes post-implantatoires a été observée chez le lapin à la dose de 60 mg/kg pc/j, effet ayant servi à établir l'ARfD.

Isfetamid : une augmentation des variations squelettiques a été observée chez le lapin à la dose de 300 mg/kg pc/j, effet critique ayant servi à établir l'ARfD.

Isopyrazam : l'ARfD a été établie à partir d'une étude de tératogénèse chez le rat qui montre à la dose de 75 mg/kg pc/j des retards d'ossification, et à plus forte dose, des malformations oculaires (cf. section 8.4). Ces observations ont conduit le RAC (2020) à classer l'isopyrazam comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B pour le développement.

Penthiopyrad : l'ARfD a été établie à partir d'une étude de tératogénèse chez le lapin qui montre à la dose de 225 mg/kg pc/j, une réduction du poids corporel des fœtus et à plus forte dose, des malformations oculaires (cf. section 8.4).

Pydiflumetofen : une augmentation des variations squelettiques chez le lapin a été observée à la dose de 100 mg/kg pc/j, effet critique ayant servi à établir l'ARfD proposée par le GT ainsi que l'AOEL actuellement en vigueur. Dans l'étude sur deux générations, un retard pubertaire a été observé (retard de l'ouverture vaginale et de la séparation préputiale). Cet effet apparaît à une dose supérieure à celles utilisées pour dériver les VTR. Cette observation a conduit le RAC (2019) à classer le pydiflumetofen comme toxique pour la fertilité de catégorie 2.

Aux doses ayant servi à établir les différentes VTR, certains effets sur la reproduction et le développement ont été constatés : diminution de la mobilité des spermatozoïdes exclusivement pour le benzovindiflupyr, diminution du poids fœtal pour le bixafen et penthiopyrad, pertes implantatoires et résorptions fœtales pour le flutolanil et le fluxapyroxad, variations squelettiques pour l'isofetamid et le pydiflumetofen. S'agissant de l'isopyrazam, des retards d'ossification et des malformations oculaires sont à l'origine du classement 1B pour la toxicité sur le développement. Concernant le pydiflumetofen, cette substance est classée toxique pour la reproduction de catégorie 2 sur la base des retards pubertaires retrouvés dans l'étude sur 2 générations. En conclusion, les effets délétères pour la reproduction et le développement, lorsqu'ils sont présents, sont variables en fonction des SDHI et ne permettent pas d'identifier un ou des effets communs aux SDHI.

8.8 Autres

8.8.1 Cardiotoxicité développementale

Des effets sur le développement cardiaque ont été rapportés uniquement dans le dossier réglementaire de l'**isopyrazam**. Des malformations cardiaques ont été mises en évidence chez 7 fœtus sur 57 à la concentration la plus forte testée (400 mg/kg pc/j) dans une étude développementale chez le lapin. Ces effets significatifs apparaissent à des doses supérieures à celles ayant servi de base aux VTR. Cependant, ces effets sont considérés comme accidentels dans le dossier réglementaire car n'apparaissant que dans une seule étude sur 4. Il est à noter que les effets observés sur la morphologie cardiaque (hypertrophie) et péricardique (œdème) pourraient aussi résulter de la compensation physiologique d'une atteinte bioénergétique cardiaque, sans nécessairement résulter d'un effet sur le développement du cœur.

Il est rapporté dans la littérature que l'exposition des fœtus de poissons-zèbres à des concentrations croissantes d'isopyrazam (0,025 à 0,5 mg/L) induit une mortalité accrue dès la dose de 0,15 mg/L et un rythme cardiaque perturbé dès 0,05 mg/L (Yao, Xu, et al. 2018).

Pour les autres SDHI, il n'y a pas d'effet sur le développement cardiaque rapporté dans les dossiers réglementaires. Dans la littérature, des données supplémentaires existent sur les effets de certains SDHI sur les embryons de poissons zèbres.

Le bixafen induit une dysplasie cardiaque et un œdème cardiaque, une diminution de la fréquence cardiaque chez les embryons de poissons zèbres exposés à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,9 µM (Yuan, Li, et Xiao 2021).

La carboxine induit une toxicité cardiaque chez les embryons de poissons zèbres avec des changements morphologiques macroscopiques au niveau du cœur, une augmentation dépendante de la dose de la mortalité au-delà de 1 mg/L et une réduction dose-dépendante du rythme cardiaque à toutes les doses testées (0,75 à 8 mg/L) (Y. Huang et al. 2022). Ces observations sont associées à des changements significatifs dans l'expression des gènes de développement cardiaque et des gènes impliqués dans la régulation du stress oxydant.

Le flutolanil induit, sur les embryons de poissons zèbres exposés à des doses comprises entre 1,5 et 3,1 mg/L (4,6 et 9,6 µM), un ralentissement du rythme cardiaque à partir de 2,5 mg/L (7,7 µM) et un œdème péricardique (Y. Yang et al. 2016).

Pour le fluxapyroxad, des différences de la morphologie cardiaque (extension ventrale) sont observées chez des embryons de poissons zèbres exposés à 1, 2 et 4 µM (W. Li, Guo, et Miao 2022). Les auteurs rapportent une augmentation significative de ces effets aux deux plus fortes doses, une réduction de la survie à la dose la plus forte et une réduction du rythme cardiaque à toutes les doses étudiées. Enfin, l'analyse transcriptomique montre des variations significatives de l'expression de certains gènes impliqués dans le développement cardiaque mais aussi la contraction et l'homéostasie du calcium.

En résumé, peu rapporté dans les dossiers réglementaires, le développement cardiaque n'apparaît pas clairement comme étant une cible des SDHI à des doses utilisées pour l'élaboration des VTR. Le GT souligne la nécessité de porter une attention accrue à l'examen du cœur dans les analyses réglementaires, au regard des données issues de la littérature sur le poisson zèbre et des observations dans le dossier de l'isopyrazam.

8.8.2 Perturbation endocrinienne

Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait, induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations. Dans la réglementation sur les substances phytopharmaceutiques (CE n°1107/2009), l'évaluation de la perturbation endocrinienne doit se conformer à la méthodologie du guide de l'ECHA/EFSA (ECHA, EFSA and JRC et al. 2018). Lors de la revue des documents réglementaires par le GT, certaines substances font état d'effets susceptibles d'être expliqués par un mécanisme de perturbation endocrinienne. Le GT note aussi que tous les dossiers revus sur les SDHI sont antérieurs à la mise en application du document guide et n'ont par conséquent pas été investigués suffisamment pour leurs potentiels perturbateurs endocriniens. Par ailleurs, l'évaluation exhaustive du caractère PE des SDHI ne fait pas partie du mandat de ce GT.

Enfin, une évaluation complète du potentiel PE selon le document guide est en cours au niveau de l'UE pour plusieurs substances et sera exigée lors de la réévaluation pour toutes les substances actives. Le GT souligne que l'évaluation du potentiel PE de ces substances devra faire l'objet d'une attention particulière lors de leur réévaluation, au regard des effets observés par le GT, notamment sur la thyroïde et les surrénales.

9 Conclusion du GT

Le GT SDHI a inclus dans l'expertise les substances actives (SA) phytopharmaceutiques SDHI ayant eu une évaluation européenne disponible au moment des travaux, soit 14 SA SDHI.

Conformément aux attendus de la saisine, le GT SDHI a, dans un premier temps, examiné les VTR actuellement en vigueur (AOEL, ARfD, DJA) afin de faire des propositions de modifications si nécessaire. Pour ce faire, il a basé son analyse sur les dossiers réglementaires de 14 substances SDHI et plus particulièrement sur le résumé de l'évaluation de l'état membre rapporteur (volume 1) et les données de toxicité et de métabolisme (volume 3B6), le document des conclusions de l'EFSA ainsi que les opinions du RAC. Selon les besoins, les experts ont eu accès aux documents détaillés des études. Simultanément, une recherche bibliographique des données scientifiques disponibles dans la littérature académique a été entreprise avec comme objectif d'identifier des effets néfastes des SDHI et des mécanismes de toxicité sous-jacents. Il est à rappeler que l'objectif de ce rapport n'est pas de réaliser un profil toxicologique exhaustif de chacune des substances.

L'analyse des 39 VTR examinées pour les 14 composés de la famille des SDHI, a conduit le GT à proposer des modifications de VTR pour 11 d'entre elles dont 3 AOEL, 3 ARfD (2 remises en cause et 1 nouvelle proposée) et 5 DJA. Ces modifications sont motivées par une requalification des NOAEL en LOAEL, la sélection d'études clés jugées plus pertinentes ou l'ajout d'un facteur d'incertitude supplémentaire. Ces modifications ont conduit à diminuer ces VTR au minimum d'un facteur 1,5 et au maximum d'un facteur 3,3.

Le GT constate qu'un certain nombre de SDHI ont des organes sensibles communs, incluant le système nerveux central et périphérique dont les yeux, les reins, la thyroïde, les surrénales et le foie. En particulier, le GT note des analogies entre les effets induits par une inactivation génétique de la SDH chez l'humain et une toxicité provoquée par les SDHI sur les surrénales. Le GT observe que l'étude du lien entre l'exposition aux SDHI et l'inhibition de la SDH n'est pas un requis réglementaire et est donc absente des dossiers industriels. Par ailleurs, l'analyse de la littérature n'a pas permis de répondre à cette interrogation. Le GT souligne l'importance de développer des AOP spécifiques résultant d'un déficit mitochondrial en complexe II (voir RECO4- Favoriser le développement des AOP (« adverse *outcome pathway* »)).

La revue des VTR par le GT met en évidence des incertitudes, en lien avec les niveaux de confiance, globalement moyens voire moyens faibles, attribués à ces valeurs. Des analyses complémentaires permettraient de mieux caractériser les dangers potentiels et de conforter/modifier les VTR et ainsi réduire les incertitudes (voir RECO1- Mise en place d'une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques).

Les études toxicocinétiques des dossiers réglementaires des SDHI, réalisées avec un marquage radio-actif, ne permettent pas de différencier le composé parent des métabolite(s) d'intérêt, et donc, d'estimer la distribution par organes. Cela ne permet pas de réaliser des modèles PBPK génériques (voir RECO3- Améliorer les études de pharmacocinétique de manière générale en vue de l'exploitation de données toxicologiques in vitro).

De plus, le GT considère que l'évaluation actuelle des SDHI seuls est incomplète. Une évaluation des dangers devrait être réalisée pour les formulations contenant des substances actives ayant un effet sur la chaîne respiratoire et susceptibles d'influencer les effets retrouvés.

Le GT note des lacunes importantes dans certains dossiers réglementaires. Des expérimentations complémentaires de la néphrotoxicité ou de la neurotoxicité y compris durant le développement, sont nécessaires en raison de signes d'appel (cf. section 8). Certaines études expérimentales présentant une mortalité élevée ont été prises en considération lors des évaluations réglementaires alors qu'elles auraient dû être rejetées et donc refaites. Le GT déplore également l'usage inapproprié des contrôles historiques pour rejeter des effets significatifs. Par ailleurs, les dossiers n'ont pas investigué le potentiel perturbateur endocrinien, leur évaluation étant antérieure à la mise en application du document guide de 2018. L'évaluation de la demande de renouvellement de l'approbation de ces substances devrait s'assurer de combler ces lacunes.

En outre, les tests requis lors de l'évaluation des dossiers réglementaires de ces substances n'apparaissent ni adéquats, ni suffisants, pour évaluer la toxicité spécifique des SDHI, au regard des données de la littérature. Ceci pousse le GT à faire des recommandations spécifiques sur le besoin de mettre en œuvre une stratégie de tests visant à évaluer la mitotoxicité et d'adapter certaines lignes directrices de l'OCDE (voir RECO1- Mise en place d'une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques).

Concernant les données épidémiologiques, l'expertise de l'INSERM (2021) a constaté qu'il n'existait à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets des substances actives SDHI sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La recherche bibliographique réalisée par le GT n'a pas permis d'identifier des données supplémentaires. Le GT attire l'attention sur la possible vulnérabilité des populations chez lesquelles la chaîne respiratoire est dysfonctionnelle (environ 1 personne sur 4000 en France³¹) en cas d'exposition, notamment professionnelle, à des SDHI.

Enfin, même si l'objet de la saisine ne concernait que les dangers, le GT souligne le manque de données d'exposition et d'imprégnation des populations qui entrainerait des difficultés pour apprécier le risque sanitaire (voir RECO2- Améliorer les connaissances sur les niveaux d'exposition des populations aux SDHI). De plus, le GT recommande la réalisation d'une expertise relative à l'impact des SDHI sur la biodiversité et la santé des écosystèmes (voir RECO5- Evaluer les effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité).

³¹ <https://carammel.org/about>

10 Recommandations et perspectives

RECO1- Mise en place d'une approche intégrée de l'évaluation de la mitotoxicité en général et de l'inhibition du complexe II en particulier dans le cadre d'une évaluation réglementaire pour les substances chimiques

Le GT recommande le développement d'une stratégie séquentielle pour évaluer le potentiel mitotoxique (**RECO1A1** et **RECO1A2**, **RECO1C**) et ses conséquences fonctionnelles (**RECO1B**), mettant en œuvre une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* en s'inspirant de ce qui a été fait par l'US EPA (Hallinger et al. 2020).

Les protocoles des études doivent être définis ou adaptés pour la réalisation de ces investigations, nécessitant la création ou la mise à jour des lignes directrices.

Le GT recommande une première évaluation de la mitotoxicité (RECO1A) par :

- la réalisation de trois tests pour évaluer la fonction de phosphorylation oxydative (cf. détails **RECO1A1** ci-dessous).

Le GT recommande dans le cas où la batterie de tests proposée dans la RECO1A1 identifie une altération de la fonction de phosphorylation oxydative :

- la réalisation de tests *in vitro* complémentaires (cf. détails **RECO1A2** ci-dessous).

Dans le cas d'une mitotoxicité qui ne serait pas en lien avec une inhibition du complexe II, le GT recommande le développement de tests complémentaires spécifiques.

Le GT recommande dans le cas où la batterie de tests proposée dans la RECO1A (RECO1A1 et RECO1A2) identifie une inhibition du complexe II :

- la réalisation, dans des modèles vertébrés adaptés *in vivo*, de tests fonctionnels et analytiques appropriés pour évaluer les effets sur les tissus et organes, en particulier ceux identifiés comme sensibles dans le présent rapport (section 8) ou dans la littérature (cf. détails **RECO1B** ci-dessous) ;
- la réalisation, à l'issue de ces tests *in vivo*, de tests enzymatiques pour évaluer l'activité du complexe II (SQR/SDH) dans les tissus et organes concernés par la RECO1B (cf. détails **RECO1C** ci-dessous).

Détails RECO1A

L'intégrité des fonctions mitochondriales peut être évaluée par la mesure de :

- 1^{er} niveau (évaluation de la fonction de phosphorylation oxydative : **RECO1A1**)
 - la respiration cellulaire,
 - l'activité enzymatique des complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale (complexes I à V),
 - le niveau d'ATP mitochondrial.

Si au moins l'un de ces trois tests montre une altération, les tests suivants doivent être réalisés :

- 2^{ème} niveau (caractérisation de la mitotoxicité : **RECO1A2**)

- la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales,
- la mesure du niveau de métabolites mitochondriaux importants pour le marquage épigénétique (succinate, fumarate, acétyl-coA, alpha cétooglutarate, s-adenyl méthionine). Si un effet sur les métabolites mitochondriaux est détecté, le GT recommande l'évaluation de l'état de méthylation de l'ADN,
- la mort cellulaire programmée liée à la mitotoxicité,
- la mesure de la densité et de la dynamique (fusion / fission) mitochondriale.

Ces mesures doivent être réalisées sur **plusieurs modèles cellulaires** incluant en priorité des lignées humaines adéquates, dont l'étude pourra être complétée par l'utilisation de cultures primaires de cellules animales et de modèles d'embryons de poissons zèbres ou de xénope. Dans la mesure du possible, les modèles cellulaires utilisés devront être pertinents vis à vis des tissus et organes identifiés comme sensibles.

Détails RECO1B

Le GT recommande de réaliser *in vivo* des tests fonctionnels et analytiques appropriés pour évaluer les effets sur les fonctions suivantes, dans le cas où la batterie de tests proposée dans la RECO1A identifie une inhibition du complexe II :

➤ **Fonctions neuromusculaires :**

Le GT recommande, à l'image des recommandations de l'EFSA sur le lien entre inhibition du complexe I et les déficits moteurs de type parkinsonien :

- la réalisation d'investigations neuropathologiques appropriées, incluant une évaluation *in vivo* de l'intégrité du système nerveux dopaminergique au niveau de la substance noire *pars compacta* (corps cellulaires neuronaux) et du striatum (prolongements neuronaux) ((EFSA et al. 2017).
- la caractérisation des effets sur les neurones dopaminergiques humains *in vitro* par analyse de la cytotoxicité et quantification des pertes neuritiques en cultures cellulaires (lignées cellulaires SH-SY5Y, LUHMES) (Delp et al. 2021; OCDE 2020)

Le GT recommande également la réalisation de tests fonctionnels chez le rongeur, comme décrits dans les lignes directrices de l'OCDE dans les études de toxicité répétée et de neurotoxicité, tels que :

- test d'agrippement (grip test),
- test d'équilibre et de coordination locomotrice (Rotarod),
- test d'activité locomotrice en champ ouvert.

➤ **Neurodéveloppement :**

Le GT recommande la réalisation systématique de l'étude de neurotoxicité du développement (OCDE 426) considérant les conséquences délétères pour le neurodéveloppement pouvant être en lien avec une inhibition de la SDH. L'atteinte de la thyroïde retrouvée pour la majorité des substances étudiées par le GT constitue également un signal d'alerte pour l'exploration d'un effet sur le neurodéveloppement. Cette ligne directrice permet d'explorer des fonctions motrices chez les nouveaux-nés de rats, de réaliser des tests cognitifs et de réaliser des analyses post-mortem sur différentes structures du SNC. Une attention particulière doit être portée sur une analyse systématique de la taille des globes oculaires et de l'aspect du cristallin (morphologie externe) et de la lamination de la rétine (après coupe micrométrique).

➤ **Fonctions rénales et surrénaliennes :**

Le GT recommande qu'une analyse soit dédiée spécifiquement à la **fonction rénale** et rapportée clairement dans les dossiers réglementaires, sur l'ensemble des études de 28 jours, 90 jours et 2 ans, ainsi que sur les études de reprotoxicité (1 et 2 générations) et de toxicité développementale. Plus précisément, le GT recommande :

- l'exploration de la filtration glomérulaire (ex. dosage de la cystatine, mesure du débit de filtration glomérulaire (ex. inulin, sinistrin-FITC)),
- l'évaluation de l'intégrité de la barrière glomérulaire (marquage immunohistologique, ex. néphrine/podocine), en plus des paramètres déjà inclus dans les lignes directrices de l'OCDE et afin de détecter précocement une altération de la fonction rénale.

Le GT recommande de mieux étudier la **fibrose et maladie rénale chronique** par :

- des marquages spécifiques, parmi lesquels l'anti-membrane basale glomérulaire (MBG), la chaîne alpha 1 des collagènes de type I et IV, la fibronectine, l'Alpha Smooth Muscle Actin (αSMA), le TGF-beta.

Le GT recommande d'évaluer la **fonction surrénalienne** qui, en plus d'être une cible pertinente dans le cas d'une altération de l'activité SDH, peut également impacter le fonctionnement rénal, par :

- le dosage plasmatique des hormones surrénaliennes (minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, androgènes, catécholamines), en plus de l'analyse du poids et de l'histologie des surrénales déjà incluse dans les lignes directrices de l'OCDE.

Détails RECO1C

Le GT recommande, dans le cas où la batterie de tests proposée dans la RECO1A identifie une inhibition du complexe II et à l'issue des études *in vivo* de la RECO1B, que l'altération de l'activité du complexe II soit évaluée dans les tissus et organes sensibles (cf. chapitre 8), dans le cadre des études de toxicologie par :

- le dosage du succinate dans le plasma et les tissus/organes sensibles (ex. immunotest, LC-MS/MS),
- la mesure des activités du complexe II (SDH/SQR) dans les tissus/organes sensibles.

RECO2- Améliorer les connaissances sur les niveaux d'exposition des populations aux SDHI

Le GT recommande de :

- intégrer les SDHI dans les programmes nationaux de biosurveillance,
- introduire les SDHI dans les substances recherchées dans les futures études d'alimentation totale, y compris infantile, et de coupler ces informations aux études individuelles nationales des consommations alimentaires,
- soutenir les recherches épidémiologiques à visée étiologique destinées à identifier les potentiels effets sanitaires des SDHI, en population générale ou professionnellement exposée, basées sur des mesures objectives d'exposition.

RECO3- Améliorer les études de pharmacocinétique de manière générale en vue de l'exploitation de données toxicologiques *in vitro*

(1) Rôle des données pharmacocinétiques vis-à-vis des tests toxicologiques.

Les données de tests toxicologiques *in vivo* ou *in vitro* permettent de préciser les types d'effets ou « dangers » rencontrés après l'exposition à une substance active, et de réaliser différentes investigations selon les essais mis en œuvre telles que les amplitudes d'effets à différentes doses par comparaison aux contrôles négatifs des études. Ces données permettent également de fixer une dose/concentration critique *in vivo* ou *in vitro* après étude de la relation dose/concentration – réponse. La dose critique retenue quantifie la quantité de substance active au-delà de laquelle un ou des type(s) de danger(s) peuvent avoir lieu. En pratique, cette dose critique permet d'établir une valeur toxicologique de référence (VTR). Cette VTR sert de point de comparaison par rapport aux estimations d'exposition réalisées sur la base de scénarii en situation d'usage de la substance active. L'estimation de l'exposition et sa comparaison à la dose critique permet d'estimer le *risque* de survenue d'un effet toxicologique *i.e.*, de conduire une évaluation quantitative du risque sanitaire (EQRS).

La pharmacocinétique doit permettre d'étudier quantitativement le devenir de la substance d'intérêt au cours du temps dans un organisme, y compris dans les organes cibles. La connaissance des paramètres pharmacocinétiques d'une substance permet de caractériser la relation concentration/effet dans l'organe. Ces études de pharmacocinétique ont donc une importance significative en EQRS (évaluation quantitative des risques sanitaires) en complément des données purement toxicologiques, dites de danger, reliant la dose externe à l'effet clinique observé.

(2) Problématiques et limites de l'utilisation de méthodes de radio-marquage sans couplage à d'autres méthodes de séparation et quantification

De nombreux dossiers de substances actives reposent sur des estimations ADME faisant appel à une mesure de signal issu d'un radio-marquage de la substance active. Le radio-marquage est une méthodologie ancienne, avant que les méthodes d'analyse modernes (HPLC/LC/MS) ne soient disponibles en routine. Ce recours à une technologie ancienne s'explique par le fait que les études ADME utilisées en toxicologie réglementaire avaient initialement pour seul but de montrer que les animaux utilisés dans les études toxicologiques avaient reçu suffisamment de substance active. Le signal que le radio-marquage fournit est relatif à la fois la substance active absorbée et distribuée et son/ses métabolismes et leur élimination. En l'absence d'autre méthode d'analyse combinée, il est impossible de distinguer le signal radioactif issu de la substance administrée parente de celui issu des métabolites. Cette limite peut être référée comme étant une problématique dite de « radioactivité totale ».

Dans les monographies disponibles pour les substances actives examinées lors de ce GT, la quantification portait principalement sur l'absorption, la distribution et l'élimination de la radioactivité totale. Néanmoins, ces données permettent d'établir le pourcentage de radioactivité totale mesurée dans les différents tissus considérés. Habituellement, le coefficient de partition octanol/eau ($\log K_{ow}$) sert de proxy pour apprécier la diffusion d'une substance dans les tissus lipophiles. Même si ce $\log K_{ow}$ dans le cas des SDHI est supérieur à 2, suggérant une distribution importante de la substance parente dans les tissus à forte teneur en lipides, une radioactivité est retrouvée également dans les autres types de tissus moins lipophiles. Dans ces tissus, ce sont en théorie plutôt les métabolites les plus hydrophiles qui se retrouvent majoritairement. Dans les dossiers étudiés, les métabolites et les substances parentes étaient séparées et quantifiés individuellement dans les fèces et l'urine, mais pas dans les tissus. Ce qui ne permet pas de déterminer leurs distributions tissulaires individuelles

RECO3A : Le GT recommande donc d'inclure la quantification des composés d'intérêt de manière à pouvoir distinguer la substance parente de ses métabolites dans les différents tissus, dans les études de toxicocinétique.

(3) Adaptation et exploitation nécessaires des données pharmacocinétiques pour l'interprétation des données issus de tests mécanistiques *in vitro*

Les données issues de tests *in vitro*, notamment, sur les complexes de la chaîne mitochondriale de transport des électrons ou de mesures de l'ATP, fournissent des concentrations d'inhibition à 50% ou 25% de ces complexes. Ces concentrations sont relatives aux concentrations nominales du test *in vitro* conduit, on parle communément par souci de concision de « concentration interne » puisque le niveau d'échelle est *a minima* interne à un organe (par ex. : le cerveau) voire cellulaire (par ex. : des neurones dopaminergiques de la substance noire (*substantia nigra*)). Pour pouvoir estimer et quantifier si les mécanismes observés *in vitro* sont susceptibles d'être activés chez l'humain, il est nécessaire de comparer les concentrations inhibitrices à un niveau d'exposition interne estimé, dans la même espèce, afin d'être au même niveau d'échelle. Cependant, les modèles d'exposition en vigueur font appel à des données d'exposition « externe » auxquelles des pourcentages de passage sont simplement appliqués sans prendre en compte les paramètres physiologiques humains qui déterminent les paramètres ADME et conséquemment l'exposition interne qui en résulte dans chaque organe d'intérêt. La prise en compte de ces processus physiologiques ADME et la détermination de l'exposition « interne » est réalisée par la modélisation dite « PBPK » pour « *Physiologically-Based Pharmacokinetic* ».

Ainsi lorsque les substances radiomarquées sont couplées à des techniques d'analyse, il devient possible de caractériser à la fois le composé parent et les métabolites par séparation, identification et quantification, notamment par HPLC-MS/MS. Cette quantification séparée des métabolites actifs et du composé parent permet alors de construire un modèle PBPK pour la substance étudiée. Cette méthodologie permet d'estimer l'exposition « interne » *a minima* dans le(s) organe(s) cibles. Il est alors possible de s'affranchir de la problématique d'échelle (décrite au paragraphe ci-dessus) et de convertir les données d'exposition externe en situation d'usage du produit phytopharmaceutique, en expositions « internes » et de les comparer aux concentrations inhibitrices *in vitro*. Un second avantage est de simuler l'exposition d'un composé parent ou de ses métabolites dans des tissus spécifiques qui ne sont pas disponibles pour l'échantillonnage. De fait, les effets toxicologiques de certains composés dépendent de la concentration dans les tissus, ce qui est particulièrement important.

RECO3B :

LE GT recommande l'utilisation de la modélisation PBPK pour la prise en compte des processus physiologique ADME, la détermination de l'exposition interne à partir de l'exposition externe et l'estimation des concentrations *in vivo* à partir des concentrations effectives *in vitro*.

Afin d'écartier un possible biais galénique influençant la pharmacocinétique et de pouvoir relier de manière rigoureuse les données ADME aux données de toxicité, il est nécessaire de réaliser les études ADME par gavage avec les mêmes formulations aqueuses que pour les études de toxicité par gavage. L'utilisation de dispersants différents influence l'absorption en la favorisant et induit de fait un biais de comparaison des études (Strickley 2004; Gelderblom et al. 2001).

Un nombre important d'études règlementaires revues dans le cadre de ce GT ont utilisé des véhicules aqueux de formulations (p. ex : Tween 80, CMC, DMSO, crémophor EL, Tragacanth, PEG-400 ...) afin de solubiliser des composés parents peu solubles dans l'eau. Cependant, pour les études de toxicité de ces mêmes composés, d'autres formulations aqueuses ont été utilisées ou encore ces études n'en ont pas utilisé. Cette approche peut avoir

un impact sur la biodisponibilité lors des études de courte durée par gavage. Pour les études subchroniques ou chroniques, l'impact est négligeable, car les SDHI étudiés ont été administrés dans la nourriture assurant l'homogénéité de la dispersion des composés dans le tractus gastro-intestinal.

Enfin, les données ADME présentées dans les dossiers devraient également être établies pour des administrations par voie intraveineuse (IV). Les données IV permettent, en effet, d'estimer beaucoup plus précisément l'élimination (clearance) qu'avec des données obtenues par voie orale³² (clearance apparente). En disposant de données à la fois par voie orale et intraveineuse, il est en fait possible d'estimer la fraction de substance oralement biodisponible, c'est-à-dire le pourcentage de substance qui gagne le compartiment systémique après exposition orale, et par conséquent d'établir un modèle d'exposition plus robuste (la biodisponibilité étant le paramètre qui permet de passer d'une clearance apparente à la clearance réelle de la substance).

RECO3C :

Le GT recommande d'utiliser les mêmes formulations aqueuses pour solubiliser les substances SDHI entre les études de toxicocinétique et les études de toxicité répétée par gavage.

Le GT recommande de faire une étude intraveineuse en parallèle à l'étude toxicocinétique à dose unique par voie orale.

RECO4- Favoriser le développement des AOP (« *adverse outcome pathway* »)

Afin de structurer les informations disponibles à ce jour et d'orienter des stratégies de tests intégrées (« *Integrated Test Strategy* » (ITS)) pertinentes et adaptées au profil de toxicité des SDHI, le GT recommande de promouvoir la construction d'AOP. Les AOPs (« *Adverse Outcome Pathways* ») correspondent à une construction logique établissant le lien, par l'entremise d'une série d'événements clefs, entre l'évènement initial déclencheur (interaction avec d'agent chimique avec un récepteur par exemple) et un effet néfaste sur la santé au niveau de l'organisme, d'une population, ouvrant la voie à l'évaluation des dangers (Ankley et al. 2010). Plus spécifiquement, le premier élément de cette chaîne séquentielle, l'évènement moléculaire initiateur (« *molecular initiating event* » (MIE)) est relié à des évènements clés distaux (« *key event* » (KE)). Ces évènements clés sont liés entre eux par des « relations entre évènements clés » (« *key event relationship* » (KER)). L'effet néfaste est défini comme le résultat de la relation entre l'évènement moléculaire initiateur et les évènements clés.

À ce jour, il existe plusieurs AOP qui décrivent une chaîne d'évènements entre l'inhibition de la fonction mitochondriale et un effet néphrotoxique³³ ou hépatique³⁴. Une AOP spécifique du complexe 1 de la chaîne mitochondriale est notamment décrite en rapport avec le développement du syndrome parkinsonien (Figure 20)(Terron et al. 2018).

³² Par voie orale, il n'est pas exclu que l'absorption orale soit plus lente que l'élimination, en situation dite de « flip-flop » pharmacocinétique et que la valeur estimée apparemment pour l'élimination orale soit en réalité celle de l'absorption. Seule la valeur d'élimination IV permet de confirmer l'élimination orale.

³³ https://aopwiki.org/system/dragonfly/production/2022/01/31/2eocyt1tr6u_AOP_Diagram_updated_Jan_31_2022.jpg;

https://aopwiki.org/system/dragonfly/production/2022/04/08/3umqhgrbmu_Gueguen_Y_AOPKidney_failure.jpg

³⁴ https://aopwiki.org/system/dragonfly/production/2019/06/07/37sevwndly_Screenshot_from_2019_06_07_15_36_37.png

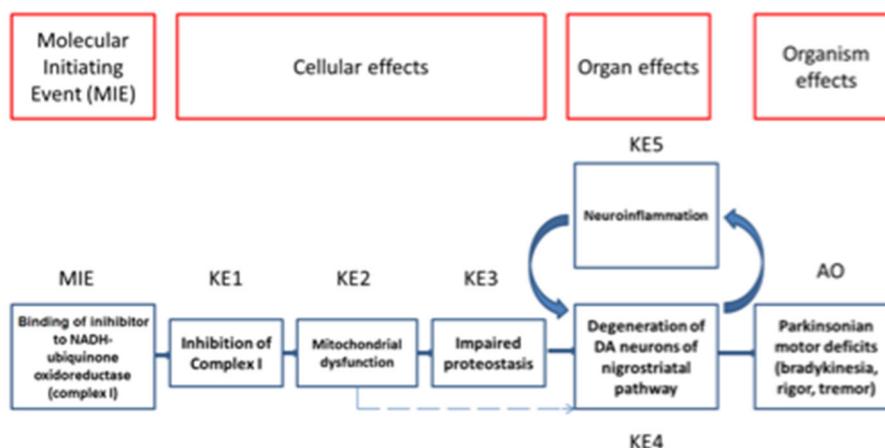


Figure 20: Liaison d'un inhibiteur de la NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I)³⁵

Pour les inhibiteurs de la SDH, aucune AOP n'a été publiée à ce jour. Sur la base des données de variants génétiques de la SDH et de pathologies tumorales (PCC, PGL, GIST) chez l'humain et de l'observation de tumeurs chez les rongeurs exposés à des SDHI, une AOP « inactivation de la SDH et cancérogenèse » peut être envisagée.

Assez récemment des expérimentations conduites chez le poisson-zèbre montrent un potentiel toxique des SDHI sur le développement et le neurodéveloppement (Yanicostas et Soussi-Yanicostas 2021), avec notamment des effets neurotoxiques dont certains convergent avec ceux décrits chez les mammifères dans certains dossiers réglementaires (par exemple la microphthalmie). Bien que dans ces études l'exposition des poissons soit constante et non séquentielle, que les concentrations soient parfois élevées, et que l'activité mitochondriale ne soit pas toujours évaluée, une AOP ciblant le neurodéveloppement chez le poisson-zèbre pourrait orienter vers des événements critiques à scruter particulièrement chez les mammifères.

De plus, une littérature abondante rapporte des effets neurotoxiques liés à une exposition de rongeurs ou de cellules neuronales à des inhibiteurs pharmacologiques de la SDH (3-NP et malonate, par exemple). Ces données pourraient également être utilisées pour développer une AOP « inhibition de la SDH et neurotoxicité ».

Enfin, comme les AOP peuvent être utilisées de manière bidirectionnelle (du MIE vers l'AO mais aussi de l'AO vers le MIE), une AOP « inhibition de la SDH et neurotoxicité » présenterait l'intérêt d'être utilisée de manière inverse en partant de données épidémiologiques potentielles (voir RECO2) vers le MIE (inhibition de la SDH) par une approche PBPK (voir RECO3).

Le GT recommande de développer une AOP « inactivation de la SDH et cancérogenèse »
Le GT recommande de développer des AOP « inhibition de la SDH et neurotoxicité », incluant le neurodéveloppement et la neurodégénérescence.

RECO5- Evaluer les effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité

Les dossiers réglementaires comportent un certain nombre de données d'écotoxicité qui n'ont pas été explorées par le GT. Par ailleurs, des effets des SDHI sur des organismes non-cibles,

³⁵ https://aopwiki.org/system/dragonfly/production/2018/02/25/1vwk4p05mb_4rkk0gx9a1_AOP3NewSchema_correct.png

au regard des usages de ces substances, sont documentés dans la littérature académique, notamment en ce qui concerne les abeilles, les crustacés et les poissons ([rapport d'expertise INRAE](#): Mamy et al. 2022). D'après les dossiers réglementaires, la plupart des SDHI sont persistants dans l'environnement, et certains sont classés comme toxiques ou très toxiques pour les organismes aquatiques selon le règlement CLP. Ces éléments suscitent des interrogations sur les risques que l'utilisation des SDHI peut représenter pour la santé des écosystèmes et la biodiversité, lesquels devraient être évalués de manière globale et approfondie.

Le GT recommande la mise en place d'une expertise collective consacrée spécifiquement aux effets des SDHI et à l'évaluation des risques pour la biodiversité et la santé des écosystèmes.

11 Bibliographie

11.1 Publications

- Adhikari, N., et I. S. Graver. 1988. « Genotoxic effects of some systemic pesticides: In vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats ». *Environmental Mutagenesis* 12 (2): 235-42. <https://doi.org/10.1002/em.2860120209>.
- Aggarwal, Ritesh K., Rebecca A. Luchtel, Venkata Machha, Alexander Tischer, Yiyu Zou, Kith Pradhan, Nadia Ashai, et al. 2021. « Functional succinate dehydrogenase deficiency is a common adverse feature of clear cell renal cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (39): e2106947118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106947118>.
- Ahn, Eun Hee, Kecheng Lei, Seong Su Kang, Zhi-Hao Wang, Xia Liu, Wei Hong, Yu Tian Wang, Laura E. Edgington-Mitchell, Lingjing Jin, et Keqiang Ye. 2021. « Mitochondrial Dysfunction Triggers the Pathogenesis of Parkinson's Disease in Neuronal C/EBP β Transgenic Mice ». *Molecular Psychiatry* 26 (12): 7838-50. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01284-x>.
- Akopian, G., C. Crawford, G. Petzinger, M. W. Jakowec, et J. P. Walsh. 2012. « Brief Mitochondrial Inhibition Causes Lasting Changes in Motor Behavior and Corticostriatal Synaptic Physiology in the Fischer 344 Rat ». *Neuroscience* 215 (juillet): 149-59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.060>.
- Angelova, Plamena R., Darya Vinogradova, Margarita E. Neganova, Tatiana P. Serkova, Vladimir V. Sokolov, Sergey O. Bachurin, Elena F. Shevtsova, et Andrey Y. Abramov. 2019. « Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity ». *Molecular Neurobiology* 56 (3): 2244-55. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1204-8>.
- Ankley, Gerald T., Richard S. Bennett, Russell J. Erickson, Dale J. Hoff, Michael W. Hornung, Rodney D. Johnson, David R. Mount, et al. 2010. « Adverse Outcome Pathways: A Conceptual Framework to Support Ecotoxicology Research and Risk Assessment ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (3): 730-41. <https://doi.org/10.1002/etc.34>.
- Anses. 2017. « Valeurs toxicologiques de référence (VTR) - Guide d'élaboration de VTR de l'anses - Troisième édition ». Saisine n° 2017-SA-0016. Maisons-Alfort: Anses. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBSTANCES2017SA0016Ra.pdf>.
- . 2019. « Avis de l'Anses relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI) ». Saisine n° 2018-SA-0113. Maisons-Alfort: Anses. <https://www.anses.fr/fr/system/files/PHYTO2018SA0113Ra.pdf>.
- Aoyama, Hiroaki, Masayuki Kikuta, Noriko Shirasaka, Hitoshi Hojo, Ken L. Takahashi, Naoko Shimizu, Michiko Harigae, Fukushi Taguchi, et Shoji Teramoto. 2002. « Historical Control Data on Reproductive Abilities and Incidences of Spontaneous Fetal Malformations in Wistar Hannover GALAS Rats ». *Congenital Anomalies* 42 (3): 194-201. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2002.tb00893.x>.
- Aspuria, Paul-Joseph P., Sophia Y. Lunt, Leif Våremo, Laurent Vergnes, Maricel Gozo, Jessica A. Beach, Brenda Salumbides, et al. 2014. « Succinate Dehydrogenase Inhibition Leads to Epithelial-Mesenchymal Transition and Reprogrammed Carbon Metabolism ». *Cancer & Metabolism* 2: 21. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-21>.
- Astuti, D., F. Latif, A. Dallol, P. L. Dahia, F. Douglas, E. George, F. Sköldbberg, E. S. Husebye, C. Eng, et E. R. Maher. 2001. « Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma ». *American Journal of Human Genetics* 69 (1): 49-54. <https://doi.org/10.1086/321282>.

- Baginsky, M. L., et Y. Hatefi. 1969. « Reconstitution of Succinate-Coenzyme Q Reductase (Complex II) and Succinate Oxidase Activities by a Highly Purified, Reactivated Succinate Dehydrogenase ». *The Journal of Biological Chemistry* 244 (19): 5313-19.
- Baker, D M, et R M Santer. 1990. « Development of a Quantitative Histochemical Method for Determination of Succinate Dehydrogenase Activity in Autonomic Neurons and Its Application to the Study of Aging in the Autonomic Nervous System. » *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 38 (4): 525-31. <https://doi.org/10.1177/38.4.2319123>.
- Baksh, Sanjeethan C., et Lydia W. S. Finley. 2021. « Short-Circuiting Respiration ». *Science (New York, N.Y.)* 374 (6572): 1196-97. <https://doi.org/10.1126/science.abm8098>.
- Baldi, Isabelle, Botton Jérémie, Cécile Chevrier, Xavier Coumoul, Alexis Elbaz, Stéphanie Goujon, Jean-Noël Jouzel, et al. 2021. « Pesticides et effets sur la santé : Nouvelles données ». Report, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). <https://www.hal.inserm.fr/inserm-03384960>.
- Bano, Daniele, et Pierluigi Nicotera. 2007. « Ca²⁺ Signals and Neuronal Death in Brain Ischemia ». *Stroke* 38 (2 Suppl): 674-76. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000256294.46009.29>.
- Barca, Emanuele, Giulio Kleiner, Guomei Tang, Marcello Ziosi, Saba Tadesse, Eliezer Masliah, Elan D. Louis, et al. 2016. « Decreased Coenzyme Q10 Levels in Multiple System Atrophy Cerebellum ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 75 (7): 663-72. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw037>.
- Bayley, Jean-Pierre, Henricus P. M. Kunst, Alberto Cascon, Maria Lourdes Sampietro, José Gaal, Esther Korpershoek, Adolfo Hinojar-Gutierrez, et al. 2010. « SDHAF2 Mutations in Familial and Sporadic Paraganglioma and Pheochromocytoma ». *The Lancet. Oncology* 11 (4): 366-72. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70007-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70007-3).
- Bayley, Jean-Pierre, Heggert G. Rebel, Kimberly Scheurwater, Dominique Duesman, Juan Zhang, Francesca Schiavi, Esther Korpershoek, Jeroen C. Jansen, Abbey Schepers, et Peter Devilee. 2022. « Long-Term in Vitro 2D-Culture of SDHB and SDHD-Related Human Paragangliomas and Pheochromocytomas ». Édité par Ales Vicha. *PLOS ONE* 17 (9): e0274478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274478>.
- Baysal, B. E., R. E. Ferrell, J. E. Willett-Brozick, E. C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, et al. 2000. « Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5454): 848-51. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.848>.
- Baysal, Bora E., Kitty De Jong, Biao Liu, Jianmin Wang, Santosh K. Patnaik, Paul K. Wallace, et Robert T. Taggart. 2013. « Hypoxia-Inducible C-to-U Coding RNA Editing Downregulates SDHB in Monocytes ». *PeerJ* 1: e152. <https://doi.org/10.7717/peerj.152>.
- Beal, M. F., E. Brouillet, B. Jenkins, R. Henshaw, B. Rosen, et B. T. Hyman. 1993. « Age-Dependent Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Endogenous Mitochondrial Inhibitor Malonate ». *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 1147-50. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03633.x>.
- Bénit, Paule, Agathe Kahn, Dominique Chretien, Sylvie Bortoli, Laurence Huc, Manuel Schiff, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo, et al. 2019. « Evolutionarily Conserved Susceptibility of the Mitochondrial Respiratory Chain to SDHI Pesticides and Its Consequence on the Impact of SDHIs on Human Cultured Cells ». *PloS One* 14 (11): e0224132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224132>.
- Bezawork-Geleta, Ayenachew, Jakub Rohlena, Lanfeng Dong, Karel Pacak, et Jiri Neuzil. 2017. « Mitochondrial Complex II: At the Crossroads ». *Trends in Biochemical Sciences* 42 (4): 312-25. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.003>.
- Bisbach, Celia M., Daniel T. Hass, Brian M. Robbins, Austin M. Rountree, Martin Sadilek, Ian R. Sweet, et James B. Hurley. 2020. « Succinate Can Shuttle Reducing Power from the Hypoxic Retina to the O₂-Rich Pigment Epithelium ». *Cell Reports* 31 (5): 107606. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107606>.

- Blum, D., D. Gall, L. Cuvelier, et S. N. Schiffmann. 2001. « Topological Analysis of Striatal Lesions Induced by 3-Nitropropionic Acid in the Lewis Rat ». *Neuroreport* 12 (8): 1769-72. <https://doi.org/10.1097/00001756-200106130-00050>.
- Blum, David, Marie-Christine Galas, Laetitia Cuvelier, et Serge N. Schiffmann. 2004. « Chronic Intoxication with 3-Nitropropionic Acid in Rats Induces the Loss of Striatal Dopamine Terminals without Affecting Nigral Cell Viability ». *Neuroscience Letters* 354 (3): 234-38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.034>.
- Bouillaud, Frederic. 2023. « Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Pesticides (SDHIs) and Energy Metabolism ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (4): 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms24044045>.
- Bouillaud, Frédéric, Nouredine Hammad, et Laurent Schwartz. 2021. « Warburg Effect, Glutamine, Succinate, Alanine, When Oxygen Matters ». *Biology* 10 (10): 1000. <https://doi.org/10.3390/biology10101000>.
- Boveris, A., E. Cadenas, et A. O. Stoppani. 1976. « Role of Ubiquinone in the Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide ». *The Biochemical Journal* 156 (2): 435-44. <https://doi.org/10.1042/bj1560435>.
- Brand, Martin D. 2016. « Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling ». *Free Radical Biology & Medicine* 100 (novembre): 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.
- Brenet, Alexandre, Rahma Hassan-Abdi, et Nadia Soussi-Yanicostas. 2021. « Bixafen, a Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicide, Causes Microcephaly and Motor Neuron Axon Defects during Development ». *Chemosphere* 265 (février): 128781. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128781>.
- Brouillet, E., M. C. Guyot, V. Mittoux, S. Altairac, F. Condé, S. Palfi, et P. Hantraye. 1998. « Partial Inhibition of Brain Succinate Dehydrogenase by 3-Nitropropionic Acid Is Sufficient to Initiate Striatal Degeneration in Rat ». *Journal of Neurochemistry* 70 (2): 794-805. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70020794.x>.
- Buffet, Alexandre, Nelly Burnichon, Judith Favier, et Anne-Paule Gimenez-Roqueplo. 2020. « An Overview of 20 Years of Genetic Studies in Pheochromocytoma and Paraganglioma ». *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 34 (2): 101416. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101416>.
- Cardaci, Simone, Liang Zheng, Gillian MacKay, Niels J. F. van den Broek, Elaine D. MacKenzie, Colin Nixon, David Stevenson, et al. 2015. « Pyruvate Carboxylation Enables Growth of SDH-Deficient Cells by Supporting Aspartate Biosynthesis ». *Nature Cell Biology* 17 (10): 1317-26. <https://doi.org/10.1038/ncb3233>.
- Cardozo, Marcos J., Elena Sánchez-Bustamante, et Paola Bovolenta. 2023. « Optic cup morphogenesis across species and related inborn human eye defects ». *Development* 150 (2): dev200399. <https://doi.org/10.1242/dev.200399>.
- Cavodeassi, Florencia, Sophie Creuzet, et Heather C. Etchevers. 2019. « The Hedgehog Pathway and Ocular Developmental Anomalies ». *Human Genetics* 138 (8-9): 917-36. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1918-8>.
- Cervera, Ana M., Jean-Pierre Bayley, Peter Devilee, et Kenneth J. McCreath. 2009. « Inhibition of Succinate Dehydrogenase Dysregulates Histone Modification in Mammalian Cells ». *Molecular Cancer* 8 (octobre): 89. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-89>.
- Chalupa, Leo M., et Robert W. Williams, éd. 2008. *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse*. The MIT Press. <https://doi.org/10.7551/mitpress/7578.001.0001>.
- Chen, Lilan, Ting Liu, Shu Zhang, Jinhua Zhou, Yunfei Wang, et Wen Di. 2014. « Succinate Dehydrogenase Subunit B Inhibits the AMPK-HIF-1 α Pathway in Human Ovarian Cancer in Vitro ». *Journal of Ovarian Research* 7 (décembre): 115. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0115-1>.
- Chen, X., T. Qiu, P. Xiao, et W. Li. 2022. « Retinal Toxicity of Isoflucypram to Zebrafish (Danio Rerio) ». *Aquatic Toxicology* 243. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106073>.
- Chouchani, Edward T., Victoria R. Pell, Edoardo Gaude, Dunja Aksentijević, Stephanie Y. Sundier, Ellen L. Robb, Angela Logan, et al. 2014. « Ischaemic Accumulation of

- Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS ». *Nature* 515 (7527): 431-35. <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- CIRC. 2001. « PHENOBARBITAL AND ITS SODIUM SALT ». 79.
- Coles, C.J., et T.P. Singer. 1978. « Studies on the binding of carboxin analogs to succinate dehydrogenase ». *Journal of Biological Chemistry* 253 (16): 5573-78.
- Colle, Dirleise, Danúbia Bonfanti Santos, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Juliana Montagna Hartwig, Alessandra Antunes dos Santos, Luciana Teixeira Zimmermann, Mariana Appel Hort, et Marcelo Farina. 2013. « Probenecol Increases Striatal Glutathione Peroxidase Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced pro-Oxidative Damage in Rats ». *PloS One* 8 (6): e67658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067658>.
- Commission européenne. 2001. « Draft Guidance Document GUIDANCE FOR THE SETTING OF AN ACUTE REFERENCE DOSE (ARfD) ». 7199/VI/99 rev. 5.
- . 2006. « Draft guidance for the setting and application of acceptable operator exposure levels (AOELs) ». SANCO 7531-rev 10.
- Connop, B. P., R. J. Boegman, R. J. Beninger, et K. Jhamandas. 1996. « Attenuation of Malonate-Induced Degeneration of the Nigrostriatal Pathway by Inhibitors of Nitric Oxide Synthase ». *Neuropharmacology* 35 (4): 459-65. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00194-8](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00194-8).
- Dalla Pozza, Elisa, Ilaria Dando, Raffaella Pacchiana, Elio Liboi, Maria Teresa Scupoli, Massimo Donadelli, et Marta Palmieri. 2020. « Regulation of Succinate Dehydrogenase and Role of Succinate in Cancer ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 98 (février): 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.013>.
- D'Antongiovanni, Vanessa, Serena Martinelli, Susan Richter, Letizia Canu, Daniele Guasti, Tommaso Mello, Paolo Romagnoli, et al. 2017. « The Microenvironment Induces Collective Migration in SDHB-Silenced Mouse Pheochromocytoma Spheroids ». *Endocrine-Related Cancer* 24 (10): 555-64. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0212>.
- Daujat-Chavanieu, Martine, et Sabine Gerbal-Chaloin. 2020. « Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease ». *Cells* 9 (11): 2395. <https://doi.org/10.3390/cells9112395>.
- Dautry, C., F. Condé, E. Brouillet, V. Mittoux, M. F. Beal, G. Bloch, et P. Hantraye. 1999. « Serial 1H-NMR Spectroscopy Study of Metabolic Impairment in Primates Chronically Treated with the Succinate Dehydrogenase Inhibitor 3-Nitropropionic Acid ». *Neurobiology of Disease* 6 (4): 259-68. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0244>.
- Delp, Johannes, Andrea Cediél-Ulloa, Ilinca Suciú, Petra Kranaster, Barbara MA van Vugt-Lussenburg, Vesna Munic Kos, Wanda van der Stel, et al. 2021. « Neurotoxicity and Underlying Cellular Changes of 21 Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors ». *Archives of Toxicology* 95 (2): 591-615. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02970-5>.
- Di, Shanshan, Zhiwei Wang, Tao Cang, Yunye Xie, Huiyu Zhao, Peipei Qi, Xiangyun Wang, Hao Xu, et Xinquan Wang. 2021. « Enantioselective Toxicity and Mechanism of Chiral Fungicide Penflufen Based on Experiments and Computational Chemistry. » *Ecotoxicology and Environmental Safety* 222 (octobre): 112534. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112534>.
- Doble, A. 1999. « The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 81 (3): 163-221. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00042-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00042-4).
- Doerrier, Carolina, Luiz F. Garcia-Souza, Gerhard Krumschnabel, Yvonne Wohlfarter, Andrés T. Mészáros, et Erich Gnaiger. 2018. « High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1782: 31-70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3.
- Dwight, Trisha, Un Na, Edward Kim, Ying Zhu, Anne Louise Richardson, Bruce G. Robinson, Katherine M. Tucker, et al. 2017. « Analysis of SDHAF3 in Familial and Sporadic Pheochromocytoma and Paraganglioma ». *BMC Cancer* 17 (1): 497. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3486-z>.

- ECHA, EFSA and JRC, Niklas Andersson, Maria Arena, Domenica Auteri, Stefania Barmaz, Elise Grignard, Aude Kienzler, et al. 2018. « Guidance for the Identification of Endocrine Disruptors in the Context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 ». *EFSA Journal* 16 (6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311>.
- EFSA. 2012. « Guidance on Selected Default Values to Be Used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the Absence of Actual Measured Data ». *EFSA Journal* 10 (3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579>.
- . 2013. « Investigation of the State of the Art on Identification of Appropriate Reference Points for the Derivation of Health-based Guidance Values (ADI, AOEL and AAOEL) for Pesticides and on the Derivation of Uncertainty Factors to Be Used in Human Risk Assessment ». *EFSA Supporting Publications* 10 (4). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-413>.
- EFSA, Colin Ockleford, Paulien Adriaanse, Philippe Berny, Theodorus Brock, Sabine Duquesne, Sandro Grilli, et al. 2017. « Investigation into Experimental Toxicological Properties of Plant Protection Products Having a Potential Link to Parkinson's Disease and Childhood Leukaemia ». *EFSA Journal. European Food Safety Authority* 15 (3): e04691. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4691>.
- Eichner, Lillian J., Marie-Claude Perry, Catherine R. Dufour, Nicholas Bertos, Morag Park, Julie St-Pierre, et Vincent Giguère. 2010. « MiR-378(*) Mediates Metabolic Shift in Breast Cancer Cells via the PGC-1 β /ERR γ Transcriptional Pathway ». *Cell Metabolism* 12 (4): 352-61. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.002>.
- Ema, Makoto, Hiroaki Aoyama, Akihiro Arima, Yuzo Asano, Kazuhiro Chihara, Katsumi Endoh, Sakiko Fujii, et al. 2012. « Historical Control Data on Prenatal Developmental Toxicity Studies in Rabbits ». *Congenital Anomalies* 52 (3): 155-61. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00365.x>.
- Favier, Judith, Laurence Amar, et Anne-Paule Gimenez-Roqueplo. 2015. « Paraganglioma and Pheochromocytoma: From Genetics to Personalized Medicine ». *Nature Reviews. Endocrinology* 11 (2): 101-11. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.188>.
- Ferger, B., O. Eberhardt, P. Teismann, C. de Groote, et J. B. Schulz. 1999. « Malonate-Induced Generation of Reactive Oxygen Species in Rat Striatum Depends on Dopamine Release but Not on NMDA Receptor Activation ». *Journal of Neurochemistry* 73 (3): 1329-32. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731329.x>.
- Fernagut, Pierre-O., Elsa Diguët, Mohamed Jaber, Bernard Bioulac, et François Tison. 2002. « Dopamine Transporter Knock-out Mice Are Hypersensitive to 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal Damage ». *The European Journal of Neuroscience* 15 (12): 2053-56. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02047.x>.
- Fullerton, Millie, Robert McFarland, Robert W. Taylor, et Charlotte L. Alston. 2020. « The Genetic Basis of Isolated Mitochondrial Complex II Deficiency ». *Molecular Genetics and Metabolism* 131 (1-2): 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.009>.
- Galac, S., et E. Korpershoek. 2017. « Pheochromocytomas and Paragangliomas in Humans and Dogs ». *Veterinary and Comparative Oncology* 15 (4): 1158-70. <https://doi.org/10.1111/vco.12291>.
- Gelderblom, H, J Verweij, K Nooter, et A Sparreboom. 2001. « Cremophor EL: The Drawbacks and Advantages of Vehicle Selection for Drug Formulation ». *European Journal of Cancer* 37 (13): 1590-98. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00171-X).
- Ghezzi, Daniele, Paola Goffrini, Graziella Uziel, Rita Horvath, Thomas Klopstock, Hanns Lochmüller, Pio D'Adamo, et al. 2009. « SDHAF1, Encoding a LYR Complex-II Specific Assembly Factor, Is Mutated in SDH-Defective Infantile Leukoencephalopathy ». *Nature Genetics* 41 (6): 654-56. <https://doi.org/10.1038/ng.378>.
- Ghorayeb, I., P. O. Fernagut, I. Aubert, E. Bezard, W. Poewe, G. K. Wenning, et F. Tison. 2000. « Toward a Primate Model of L-Dopa-Unresponsive Parkinsonism Mimicking Striatonigral Degeneration ». *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 15 (3): 531-36. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200005\)15:3<531::AID-MDS1017>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200005)15:3<531::AID-MDS1017>3.0.CO;2-C).

- Gimenez-Roqueplo, Anne-Paule, Judith Favier, Pierre Rustin, Claudine Rieubland, Malvina Crespin, Valérie Nau, Philippe Khau Van Kien, et al. 2003. « Mutations in the SDHB Gene Are Associated with Extra-Adrenal and/or Malignant Pheochromocytomas ». *Cancer Research* 63 (17): 5615-21.
- Girard, J. 2013. « Le rôle du rein dans l'homéostasie du glucose ». *Médecine des Maladies Métaboliques* 7 (1): 41-48. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(13\)70491-7](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(13)70491-7).
- Goffrini, Paola, Tonino Ercolino, Elena Panizza, Valentino Giachè, Leonardo Cavone, Alberto Chiarugi, Veronica Dima, Iliana Ferrero, et Massimo Mannelli. 2009. « Functional Study in a Yeast Model of a Novel Succinate Dehydrogenase Subunit B Gene Germline Missense Mutation (C191Y) Diagnosed in a Patient Affected by a Glomus Tumor ». *Human Molecular Genetics* 18 (10): 1860-68. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp102>.
- Goldberg, N. D., J. V. Passonneau, et O. H. Lowry. 1966. « Effects of Changes in Brain Metabolism on the Levels of Citric Acid Cycle Intermediates ». *The Journal of Biological Chemistry* 241 (17): 3997-4003.
- Goncalves, Judith, Sophie Moog, Aurélie Morin, Géraldine Gentric, Sebastian Müller, Alexander P. Morrell, Katarina Kluckova, et al. 2021. « Loss of SDHB Promotes Dysregulated Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and Sensitivity to Ascorbate ». *Cancer Research* 81 (13): 3480-94. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2936>.
- González-Rodríguez, Patricia, Enrico Zampese, Kristen A. Stout, Jaime N. Guzman, Ema Ilijic, Ben Yang, Tatiana Tkatch, et al. 2021. « Disruption of Mitochondrial Complex I Induces Progressive Parkinsonism ». *Nature* 599 (7886): 650-56. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04059-0>.
- Gouvern, Marc, Mireille Andriamihaja, Tobias Nübel, François Blachier, et Frédéric Bouillaud. 2007. « Sulfide, the First Inorganic Substrate for Human Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (8): 1699-1706. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7407com>.
- Greene, J. G., R. H. Porter, R. V. Eller, et J. T. Greenamyre. 1993. « Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Malonic Acid Produces an "Excitotoxic" Lesion in Rat Striatum ». *Journal of Neurochemistry* 61 (3): 1151-54. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03634.x>.
- Greim, Helmut, Andrea Hartwig, Ulrike Reuter, Hans-Bernhard Richter-Reichhelm, et Heinz-Walter Thielmann. 2009. « Chemically induced pheochromocytomas in rats: mechanisms and relevance for human risk assessment ». *Critical Reviews in Toxicology* 39 (8): 695-718. <https://doi.org/10.1080/10408440903190861>.
- Guzy, Robert D., Bhumika Sharma, Eric Bell, Navdeep S. Chandel, et Paul T. Schumacker. 2008. « Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (2): 718-31. <https://doi.org/10.1128/MCB.01338-07>.
- Hagerty, Christina H., Ann M. Klein, Catherine L. Reardon, Duncan R. Kroese, Caroline J. Melle, Kaci R. Graber, et Christopher C. Mundt. 2021. « Baseline and Temporal Changes in Sensitivity of Zymoseptoria Tritici Isolates to Benzovindiflupyr in Oregon, U.S.A., and Cross-Sensitivity to Other SDHI Fungicides ». *Plant Disease* 105 (1): 169-74. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2125-RE>.
- Hall, A. P., C. R. Elcombe, J. R. Foster, T. Harada, W. Kaufmann, A. Knippel, K. Küttler, et al. 2012. « Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-Adverse) Changes--Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop ». *Toxicologic Pathology* 40 (7): 971-94. <https://doi.org/10.1177/0192623312448935>.
- Hallinger, D.R., H.B. Lindsay, K.P. Friedman, D.A. Suarez, et S.O. Simmons. 2020. « Respiriometric Screening and Characterization of Mitochondrial Toxicants within the Toxcast Phase I and II Chemical Libraries ». *Toxicological Sciences* 176 (1): 175-92. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa059>.
- Hao, Huai-Xiang, Oleh Khalimonchuk, Margit Schradars, Noah Dephoure, Jean-Pierre Bayley, Henricus Kunst, Peter Devilee, et al. 2009. « SDH5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5944): 1139-42. <https://doi.org/10.1126/science.1175689>.

- Hass, Daniel T., Celia M. Bisbach, Brian M. Robbins, Martin Sadilek, Ian R. Sweet, et James B. Hurley. 2022. « Succinate Metabolism in the Retinal Pigment Epithelium Uncouples Respiration from ATP Synthesis ». *Cell Reports* 39 (10): 110917. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110917>.
- Hayashi, N., Y. Sasama, N. Takahashi, et N. Ikemi. 2013. « Cyflumetofen, a Novel Acaricide - Its Mode of Action and Selectivity ». *Pest Management Science* 69 (9): 1080-84. <https://doi.org/10.1002/ps.3470>.
- He, Fengsheng, Shoulin Zhang, Fangyi Qian, et Chaoli Zhang. 1995. « Delayed Dystonia with Striatal CT Lucencies Induced by a Mycotoxin (3-Nitropropionic Acid) ». *Neurology* 45 (12): 2178-83. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.12.2178>.
- HED TOXicology Science Advisory Council. 2002. « Hepatocellular hypertrophy - HED guidance document ». G2002.01.
- Her, Yeng F., et L. James Maher. 2015. « Succinate Dehydrogenase Loss in Familial Paraganglioma: Biochemistry, Genetics, and Epigenetics ». *International Journal of Endocrinology* 2015: 296167. <https://doi.org/10.1155/2015/296167>.
- Hochachka, P. W., et T. Mustafa. 1972. « Invertebrate Facultative Anaerobiosis ». *Science (New York, N.Y.)* 178 (4065): 1056-60. <https://doi.org/10.1126/science.178.4065.1056>.
- Holt, D. E., P. Henthorn, V. M. Howell, B. G. Robinson, et D. E. Benn. 2014. « Succinate Dehydrogenase Subunit D and Succinate Dehydrogenase Subunit B Mutation Analysis in Canine Phaeochromocytoma and Paraganglioma ». *Journal of Comparative Pathology* 151 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.03.007>.
- Hose, Donatienne d', Pauline Isenborghs, Davide Brusa, Bénédicte F. Jordan, et Bernard Gallez. 2021. « The Short-Term Exposure to SDHI Fungicides Boscalid and Bixafen Induces a Mitochondrial Dysfunction in Selective Human Cell Lines. » *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195842>.
- Howell, Neil. 1998. « Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve ». *Vision Research* 38 (10): 1495-1504. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(97\)00444-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(97)00444-6).
- Huang, Jingzhou, et Bernard D. Lemire. 2009. « Mutations in the C. Elegans Succinate Dehydrogenase Iron-Sulfur Subunit Promote Superoxide Generation and Premature Aging ». *Journal of Molecular Biology* 387 (3): 559-69. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.028>.
- Huang, Yong, Ziqin Wang, Yuyang Peng, Rong Xu, Jiajie Yan, Cong Xiong, Jinze Ma, Keyuan Zhong, et Huiqiang Lu. 2022. « Carboxin Can Induce Cardiotoxicity in Zebrafish Embryos. » *Ecotoxicology and Environmental Safety* 233 (mars): 113318. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113318>.
- Hurley, P. M. 1998. « Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents ». *Environmental Health Perspectives* 106 (8): 437-45. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106437>.
- Imperiale, Alessio, François-Marie Moussallieh, Philippe Roche, Stéphanie Battini, A. Ercument Cicek, Frédéric Sebag, Laurent Brunaud, et al. 2015. « Metabolome Profiling by HRMAS NMR Spectroscopy of Pheochromocytomas and Paragangliomas Detects SDH Deficiency: Clinical and Pathophysiological Implications ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 17 (1): 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.10.010>.
- Inserm. 2021. *Pesticides et effets sur la santé : Nouvelles données*. Collection Expertise Collective. Montrouge: EDP Sciences.
- Ishii, N., M. Fujii, P. S. Hartman, M. Tsuda, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa, et K. Suzuki. 1998. « A Mutation in Succinate Dehydrogenase Cytochrome b Causes Oxidative Stress and Ageing in Nematodes ». *Nature* 394 (6694): 694-97. <https://doi.org/10.1038/29331>.
- Kelly, Lorna, Kenneth Bryan, Su Young Kim, Katherine A. Janeway, J. Keith Killian, Hans-Ulrich Schildhaus, Markku Miettinen, et al. 2013. « Post-Transcriptional Dysregulation by MiRNAs Is Implicated in the Pathogenesis of Gastrointestinal Stromal Tumor [GIST] ». *PLoS One* 8 (5): e64102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064102>.

- Kim, Jin, Hanseul Oh, Bokyeong Ryu, Ukjin Kim, Ji Min Lee, Cho-Rok Jung, C.-Yoon Kim, et Jae-Hak Park. 2018. « Triclosan Affects Axon Formation in the Neural Development Stages of Zebrafish Embryos (*Danio Rerio*) ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 236 (mai): 304-12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.110>.
- Kluckova, Katarina, et Daniel A. Tennant. 2018. « Metabolic Implications of Hypoxia and Pseudohypoxia in Pheochromocytoma and Paraganglioma ». *Cell and Tissue Research* 372 (2): 367-78. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2801-6>.
- Klůčková, Katarína, Alpesh Thakker, Lisa Vettore, Cristina Escribano-Gonzalez, Rebecca L. Hindshaw, Jacqueline L. E. Tearle, Judith Goncalves, et al. 2020. « Succinate Dehydrogenase Deficiency in a Chromaffin Cell Model Retains Metabolic Fitness through the Maintenance of Mitochondrial NADH Oxidoreductase Function ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (1): 303-15. <https://doi.org/10.1096/fj.201901456R>.
- Ko, So Hee, Gee Euhn Choi, Ji Young Oh, Hyun Jik Lee, Jun Sung Kim, Chang Woo Chae, Diana Choi, et Ho Jae Han. 2017. « Succinate Promotes Stem Cell Migration through the GPR91-Dependent Regulation of DRP1-Mediated Mitochondrial Fission ». *Scientific Reports* 7 (1): 12582. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12692-x>.
- Ksenzenko, M., A. A. Konstantinov, G. B. Khomutov, A. N. Tikhonov, et E. K. Ruuge. 1984. « Relationships between the Effects of Redox Potential, Alpha-Thenoyltrifluoroacetone and Malonate on O(2) and H2O2 Generation by Submitochondrial Particles in the Presence of Succinate and Antimycin ». *FEBS Letters* 175 (1): 105-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80579-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80579-7).
- Kumar, Pushpender, Puneet Kumar, Aamir Khan, Rahul Deshmukh, et Pyare Lal Sharma. 2014. « Role of Neurosteroids in Experimental 3-Nitropropionic Acid Induced Neurotoxicity in Rats ». *European Journal of Pharmacology* 723 (janvier): 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.036>.
- Kumar, Ravi, Michael Bonert, Asghar Naqvi, Kevin Zbuk, et Anil Kapoor. 2018. « SDH-Deficient Renal Cell Carcinoma - Clinical, Pathologic and Genetic Correlates: A Case Report ». *BMC Urology* 18 (1): 109. <https://doi.org/10.1186/s12894-018-0422-8>.
- Lahiani-Cohen, Inbal, Olga Touloumi, Roza Lagoudaki, Nikolaos Grigoriadis, et Hanna Rosenmann. 2019. « Exposure to 3-Nitropropionic Acid Mitochondrial Toxin Induces Tau Pathology in Tangle-Mouse Model and in Wild Type-Mice ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 321. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00321>.
- Lake, Brian G. 2018. « Human Relevance of Rodent Liver Tumour Formation by Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activators ». *Toxicology Research* 7 (4): 697-717. <https://doi.org/10.1039/c8tx00008e>.
- Lee, Man Ryul, Charlie Mantel, Sang A. Lee, Sung-Hwan Moon, et Hal E. Broxmeyer. 2016. « MiR-31/SDHA Axis Regulates Reprogramming Efficiency through Mitochondrial Metabolism ». *Stem Cell Reports* 7 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.012>.
- Lemarie, A., et S. Grimm. 2011. « Mitochondrial Respiratory Chain Complexes: Apoptosis Sensors Mutated in Cancer? ». *Oncogene* 30 (38): 3985-4003. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.167>.
- Lepoutre-Lussey, Charlotte, Constance Thibault, Alexandre Buffet, Aurélie Morin, Cécile Badoual, Paule Bénit, Pierre Rustin, et al. 2016. « From Nf1 to Sdhb Knockout: Successes and Failures in the Quest for Animal Models of Pheochromocytoma ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 421 (février): 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.027>.
- Letouzé, Eric, Cosimo Martinelli, Céline Lorient, Nelly Burnichon, Nasséra Abermil, Chris Ottolenghi, Maxime Janin, et al. 2013. « SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma ». *Cancer Cell* 23 (6): 739-52. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>.
- Li, Jeng-Lin, Tai-Yi Lin, Po-Lin Chen, Ting-Ni Guo, Shu-Yi Huang, Chun-Hong Chen, Chin-Hsien Lin, et Chih-Chiang Chan. 2021. « Mitochondrial Function and Parkinson's

- Disease: From the Perspective of the Electron Transport Chain ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14: 797833. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.797833>.
- Li, Jibin, Ning Liang, Xiaoyu Long, Jing Zhao, Jin Yang, Xiaohong Du, Tao Yang, et al. 2019. « SDHC-Related Deficiency of SDH Complex Activity Promotes Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma via ROS/NFκB Signaling ». *Cancer Letters* 461 (octobre): 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.07.001>.
- Li, Linhao, Matthew A. Welch, Zhihui Li, Bryan Mackowiak, Scott Heyward, Peter W. Swaan, et Hongbing Wang. 2019. « Mechanistic Insights of Phenobarbital-Mediated Activation of Human but Not Mouse Pregnane X Receptor ». *Molecular Pharmacology* 96 (3): 345-54. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116616>.
- Li, Wenhua, Shanshan Guo, et Nan Miao. 2022. « Transcriptional Responses of Fluxapyroxad-Induced Dysfunctional Heart in Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos ». *Environmental Science and Pollution Research* 29 (60): 90034-45. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21981-6>.
- Lim, Dmitry, Laura Fedrizzi, Marzia Tartari, Chiara Zuccato, Elena Cattaneo, Marisa Brini, et Ernesto Carafoli. 2008. « Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Striatal Neurons of Huntington Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5780-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704704200>.
- Liot, G., B. Bossy, S. Lubitz, Y. Kushnareva, N. Sejbuk, et E. Bossy-Wetzel. 2009. « Complex II Inhibition by 3-NP Causes Mitochondrial Fragmentation and Neuronal Cell Death via an NMDA- and ROS-Dependent Pathway ». *Cell Death and Differentiation* 16 (6): 899-909. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.22>.
- Lorendeau, Doriane, Gianmarco Rinaldi, Ruben Boon, Pieter Spincemaille, Kristine Metzger, Christian Jäger, Stefan Christen, et al. 2017. « Dual Loss of Succinate Dehydrogenase (SDH) and Complex I Activity Is Necessary to Recapitulate the Metabolic Phenotype of SDH Mutant Tumors ». *Metabolic Engineering* 43 (Pt B): 187-97. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.005>.
- Loriot, Céline, Nelly Burnichon, Noémie Gadessaud, Laure Vescovo, Laurence Amar, Rossella Libé, Jérôme Bertherat, et al. 2012. « Epithelial to Mesenchymal Transition Is Activated in Metastatic Pheochromocytomas and Paragangliomas Caused by SDHB Gene Mutations ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (6): E954-962. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3437>.
- Loriot, Céline, Mélanie Domingues, Adeline Berger, Mélanie Menara, Maëva Ruel, Aurélie Morin, Luis-Jaime Castro-Vega, et al. 2015. « Deciphering the Molecular Basis of Invasiveness in Sdhb-Deficient Cells ». *Oncotarget* 6 (32): 32955-65. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5106>.
- Ludhiadch, Abhilash, Rashmi Sharma, Aishwarya Muriki, et Anjana Munshi. 2022. « Role of Calcium Homeostasis in Ischemic Stroke: A Review ». *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 21 (1): 52-61. <https://doi.org/10.2174/1871527320666210212141232>.
- Lussey-Lepoutre, Charlotte, Alexandre Buffet, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo, et Judith Favier. 2017. « Mitochondrial Deficiencies in the Predisposition to Paraganglioma ». *Metabolites* 7 (2): E17. <https://doi.org/10.3390/metabo7020017>.
- Lussey-Lepoutre, Charlotte, Alexandre Buffet, Aurélie Morin, Judith Goncalves, et Judith Favier. 2018. « Rodent Models of Pheochromocytoma, Parallels in Rodent and Human Tumorigenesis ». *Cell and Tissue Research* 372 (2): 379-92. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2797-y>.
- Lussey-Lepoutre, Charlotte, Kate E. R. Hollinshead, Christian Ludwig, Mélanie Menara, Aurélie Morin, Luis-Jaime Castro-Vega, Seth J. Parker, et al. 2015. « Loss of Succinate Dehydrogenase Activity Results in Dependency on Pyruvate Carboxylation for Cellular Anabolism ». *Nature Communications* 6 (novembre): 8784. <https://doi.org/10.1038/ncomms9784>.
- MacFarlane, James, Keat Cheah Seong, Chad Bisambar, Basetti Madhu, Kieren Allinson, Alison Marker, Anne Warren, et al. 2020. « A Review of the Tumour Spectrum of Germline Succinate Dehydrogenase Gene Mutations: Beyond Pheochromocytoma

- and Paraganglioma ». *Clinical Endocrinology* 93 (5): 528-38. <https://doi.org/10.1111/cen.14289>.
- Mamy, Laure, Stéphane Pesce, Wilfried Sanchez, Marcel Amichot, Joan Artigas, Stéphanie Aviron, Carole Barthélémy, et al. 2022. « Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques. Rapport de l'expertise scientifique collective ». Report, INRAE - IFREMER. <https://doi.org/10.17180/0gp2-cd65>.
- Maragos, William F., Kristie L. Young, Chris S. Altman, Chava B. Pocernich, Jennifer Drake, D. Allan Butterfield, Isabelle Seif, Daniel P. Holschneider, Kevin Chen, et Jean C. Shih. 2004. « Striatal Damage and Oxidative Stress Induced by the Mitochondrial Toxin Malonate Are Reduced in Clorgyline-Treated Rats and MAO-A Deficient Mice ». *Neurochemical Research* 29 (4): 741-46. <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000018845.82808.45>.
- McClain, R. M. 1989. « The Significance of Hepatic Microsomal Enzyme Induction and Altered Thyroid Function in Rats: Implications for Thyroid Gland Neoplasia ». *Toxicologic Pathology* 17 (2): 294-306. <https://doi.org/10.1177/019262338901700206>.
- Medja, F., S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, et A. Lombès. 2009. « Development and Implementation of Standardized Respiratory Chain Spectrophotometric Assays for Clinical Diagnosis ». *Mitochondrion* 9 (5): 331-39. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.05.001>.
- Monzio Compagnoni, Giacomo, Giulio Kleiner, Andreina Bordoni, Francesco Fortunato, Dario Ronchi, Sabrina Salani, Marianna Guida, et al. 2018. « Mitochondrial Dysfunction in Fibroblasts of Multiple System Atrophy ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1864 (12): 3588-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.018>.
- Monzio Compagnoni, Giacomo, Giulio Kleiner, Maura Samarani, Massimo Aureli, Gaia Faustini, Arianna Bellucci, Dario Ronchi, et al. 2018. « Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy ». *Stem Cell Reports* 11 (5): 1185-98. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.007>.
- Moog, Sophie, et Judith Favier. 2022. « [Succinate dehydrogenase in cancer] ». *Medecine Sciences: M/S* 38 (3): 255-62. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022024>.
- Moosavi, Behrooz, Xiao-Lei Zhu, Wen-Chao Yang, et Guang-Fu Yang. 2020. « Genetic, Epigenetic and Biochemical Regulation of Succinate Dehydrogenase Function ». *Biological Chemistry* 401 (3): 319-30. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0264>.
- Moreno-Sánchez, Rafael, Luz Hernández-Esquível, Nadia A. Rivero-Segura, Alvaro Marín-Hernández, Jiri Neuzil, Stephen J. Ralph, et Sara Rodríguez-Enríquez. 2013. « Reactive Oxygen Species Are Generated by the Respiratory Complex II--Evidence for Lack of Contribution of the Reverse Electron Flow in Complex I ». *The FEBS Journal* 280 (3): 927-38. <https://doi.org/10.1111/febs.12086>.
- Morin, Aurélie, Judith Goncalves, Sophie Moog, Luis-Jaime Castro-Vega, Sylvie Job, Alexandre Buffet, Marie-Joséphine Fontenille, et al. 2020. « TET-Mediated Hypermethylation Primes SDH-Deficient Cells for HIF2 α -Driven Mesenchymal Transition ». *Cell Reports* 30 (13): 4551-4566.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.022>.
- Mowery, P.C., B.A.C. Ackrell, T.P. Singer, G.A. White, et G.D. Thorn. 1976. « Carboxins: Powerful selective inhibitors of succinate oxidation in animal tissues ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71 (1): 354-61. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90290-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90290-4).
- Mowery, P.C., D.J. Steenkamp, B.A.C. Ackrell, T.P. Singer, et G.A. White. 1977. « Inhibition of mammalian succinate dehydrogenase by carboxins ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 178 (2): 495-506. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90220-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90220-X).
- Nederveen, Francien H. van, José Gaal, Judith Favier, Esther Korpershoek, Rogier A. Oldenburg, Elly M. C. A. de Bruyn, Hein F. B. M. Sleddens, et al. 2009. « An Immunohistochemical Procedure to Detect Patients with Paraganglioma and Pheochromocytoma with Germline SDHB, SDHC, or SDHD Gene Mutations: A

- Retrospective and Prospective Analysis ». *The Lancet. Oncology* 10 (8): 764-71. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70164-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70164-0).
- Ni, Ying, Spencer Seballos, Shireen Ganapathi, Danielle Gurin, Benjamin Fletcher, Joanne Ngeow, Rebecca Nagy, et al. 2015. « Germline and Somatic SDHx Alterations in Apparently Sporadic Differentiated Thyroid Cancer ». *Endocrine-Related Cancer* 22 (2): 121-30. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0537>.
- OCDE. 2020. « CASE STUDY ON THE USE OF INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF PARKINSONIAN HAZARD LIABILITY OF DEGUELIN BY AN AOP-BASED TESTING AND READ ACROSS APPROACH ». ENV/JM/MONO(2020)22.
- OMS. 1997. « Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues ». WHO/FSF/FOS/97.7.
- . 2015. « Pesticide residues in food- guidance document for WHO monographers and reviewers ». WHO/HSE/FOS/2015.1.
- Panizza, Elena, Tonino Ercolino, Luigi Mori, Elena Rapizzi, Maurizio Castellano, Giuseppe Opocher, Ileana Ferrero, Hartmut P. H. Neumann, Massimo Mannelli, et Paola Goffrini. 2013. « Yeast Model for Evaluating the Pathogenic Significance of SDHB, SDHC and SDHD Mutations in PHEO-PGL Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 22 (4): 804-15. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5487>.
- Paranagama, Madhavi P., et Kiyoshi Kita. 2018. « Differential Effect of Atpenin A5 on ROS Production from Wild- Type Mitochondrial Complex II in Human Cancer Cells and Normal Cells ». In *Mitochondrial Diseases*, édité par Eylem Taskin, Celal Guven, et Yusuf Sevgiler. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71638>.
- Pollard, P. J., J. J. Brière, N. A. Alam, J. Barwell, E. Barclay, N. C. Wortham, T. Hunt, et al. 2005. « Accumulation of Krebs Cycle Intermediates and Over-Expression of HIF1alpha in Tumours Which Result from Germline FH and SDH Mutations ». *Human Molecular Genetics* 14 (15): 2231-39. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi227>.
- Powers, James F., Brent Cochran, James D. Baleja, Hadley D. Sikes, Andrew D. Pattison, Xue Zhang, Inna Lomakin, et al. 2020. « A Xenograft and Cell Line Model of SDH-Deficient Pheochromocytoma Derived from Sdhb+/- Rats ». *Endocrine-Related Cancer* 27 (6): 337-54. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0474>.
- Puisségur, M.-P., N. M. Mazure, T. Bertero, L. Pradelli, S. Grosso, K. Robbe-Sermesant, T. Maurin, et al. 2011. « MiR-210 Is Overexpressed in Late Stages of Lung Cancer and Mediates Mitochondrial Alterations Associated with Modulation of HIF-1 Activity ». *Cell Death and Differentiation* 18 (3): 465-78. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.119>.
- Qian, Le, Suzhen Qi, Zhao Wang, Jason T. Magnuson, David C. Volz, Daniel Schlenk, Jiazhen Jiang, et Chengju Wang. 2021. « Environmentally Relevant Concentrations of Boscalid Exposure Affects the Neurobehavioral Response of Zebrafish by Disrupting Visual and Nervous Systems. » *Journal of Hazardous Materials* 404 (Pt A): 124083. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124083>.
- Qian, Le, Jie Zhang, Xiangguang Chen, Suzhen Qi, Peizhuo Wu, Chen Wang, et Chengju Wang. 2019. « Toxic Effects of Boscalid in Adult Zebrafish (Danio Rerio) on Carbohydrate and Lipid Metabolism ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 247 (avril): 775-82. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.054>.
- Qiu, Tiantong, Xin Chen, Peng Xiao, Liqiang Wang, et Wenhua Li. 2022. « Effects of Embryonic Exposure to Fluxapyroxad on Zebrafish (Danio Rerio) Ocular Development. » *Pesticide Biochemistry and Physiology* 181 (février): 105018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.105018>.
- Quinlan, Casey L., Adam L. Orr, Irina V. Perevoshchikova, Jason R. Treberg, Brian A. Ackrell, et Martin D. Brand. 2012. « Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (32): 27255-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>.
- Rapizzi, Elena, Tonino Ercolino, Rossella Fucci, Benedetta Zampetti, Roberta Felici, Daniele Guasti, Andrea Morandi, et al. 2014. « Succinate Dehydrogenase Subunit B Mutations

- Modify Human Neuroblastoma Cell Metabolism and Proliferation ». *Hormones & Cancer* 5 (3): 174-84. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0172-3>.
- Richter, Susan, Mirko Peitzsch, Elena Rapizzi, Jacques W. Lenders, Nan Qin, Aguirre A. de Cubas, Francesca Schiavi, et al. 2014. « Krebs Cycle Metabolite Profiling for Identification and Stratification of Pheochromocytomas/Paragangliomas Due to Succinate Dehydrogenase Deficiency ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (10): 3903-11. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2151>.
- Røsland, Gro V., Sissel E. Dyrstad, Deusdedit Tusubira, Reham Helwa, Tuan Zea Tan, Maria L. Lotsberg, Ina K. N. Pettersen, et al. 2019. « Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Is Associated with Attenuation of Succinate Dehydrogenase (SDH) in Breast Cancer through Reduced Expression of SDHC ». *Cancer & Metabolism* 7: 6. <https://doi.org/10.1186/s40170-019-0197-8>.
- Ross, Jillian, Simon M. Plummer, Anja Rode, Nico Scheer, Conrad C. Bower, Ortwin Vogel, Colin J. Henderson, C. Roland Wolf, et Clifford R. Elcombe. 2010. « Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Pregnane X Receptor (PXR) Support the Hypertrophic but Not the Hyperplastic Response to the Murine Nongenotoxic Hepatocarcinogens Phenobarbital and Chlordane in Vivo ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 116 (2): 452-66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq118>.
- Saskői, Éva, Zoltán Hujber, Gábor Nyírő, István Likó, Barbara Mátyási, Gábor Petővári, Katalin Mészáros, et al. 2020. « The SDHB Arg230His Mutation Causing Familial Paraganglioma Alters Glycolysis in a New *Caenorhabditis Elegans* Model ». *Disease Models & Mechanisms* 13 (10): dmm044925. <https://doi.org/10.1242/dmm.044925>.
- Saydoff, Joel A., Lian Sheng Liu, Rolando A. G. Garcia, Zhongyi Hu, Donna Li, et Reid W. von Borstel. 2003. « Oral Uridine Pro-Drug PN401 Decreases Neurodegeneration, Behavioral Impairment, Weight Loss and Mortality in the 3-Nitropropionic Acid Mitochondrial Toxin Model of Huntington's Disease ». *Brain Research* 994 (1): 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.049>.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner, et C. D. Marsden. 1990. « Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 54 (3): 823-27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, et C. D. Marsden. 1989. « Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease ». *Lancet (London, England)* 1 (8649): 1269. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92366-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92366-0).
- Schottlaender, Lucia V., Conceição Bettencourt, Aoife P. Kiely, Annapurna Chalasani, Viruna Neergheen, Janice L. Holton, Iain Hargreaves, et Henry Houlden. 2016. « Coenzyme Q10 Levels Are Decreased in the Cerebellum of Multiple-System Atrophy Patients ». *PLoS One* 11 (2): e0149557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149557>.
- Selak, Mary A., Sean M. Armour, Elaine D. MacKenzie, Houda Boulahbel, David G. Watson, Kyle D. Mansfield, Yi Pan, M. Celeste Simon, Craig B. Thompson, et Eyal Gottlieb. 2005. « Succinate Links TCA Cycle Dysfunction to Oncogenesis by Inhibiting HIF-Alpha Prolyl Hydroxylase ». *Cancer Cell* 7 (1): 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022>.
- Senoo-Matsuda, N., K. Yasuda, M. Tsuda, T. Ohkubo, S. Yoshimura, H. Nakazawa, P. S. Hartman, et N. Ishii. 2001. « A Defect in the Cytochrome b Large Subunit in Complex II Causes Both Superoxide Anion Overproduction and Abnormal Energy Metabolism in *Caenorhabditis Elegans* ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41553-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104718200>.
- Siebels, Ilka, et Stefan Dröse. 2013. « Q-Site Inhibitor Induced ROS Production of Mitochondrial Complex II Is Attenuated by TCA Cycle Dicarboxylates ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1827 (10): 1156-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.06.005>.
- Sierotzki, Helge, et Gabriel Scalliet. 2013. « A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides ». *Phytopathology* 103 (9): 880-87. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>.

- Smith, Emily H., Ralf Janknecht, et L. James Maher. 2007. « Succinate Inhibition of Alpha-Ketoglutarate-Dependent Enzymes in a Yeast Model of Paraganglioma ». *Human Molecular Genetics* 16 (24): 3136-48. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm275>.
- Smith, Richard S., Simon W. M. John, Patsy M. Nishina, et John P. Sundberg, éd. 2001. *Systematic Evaluation of the Mouse Eye: Anatomy, Pathology, and Biometrics*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420041606>.
- Souders, Christopher L., Xuefang Liang, Xiaohong Wang, Naomi Ector, Yuan H. Zhao, et Christopher J. Martyniuk. 2018. « High-Throughput Assessment of Oxidative Respiration in Fish Embryos: Advancing Adverse Outcome Pathways for Mitochondrial Dysfunction ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 199 (juin): 162-73. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.031>.
- Spinelli, Jessica B., Paul C. Rosen, Hans-Georg Sprenger, Anna M. Puszynska, Jessica L. Mann, Julian M. Roessler, Andrew L. Cangelosi, et al. 2021. « Fumarate Is a Terminal Electron Acceptor in the Mammalian Electron Transport Chain ». *Science (New York, N.Y.)* 374 (6572): 1227-37. <https://doi.org/10.1126/science.abi7495>.
- Srivastava, Tulika, Ritu Raj, Amit Dubey, Dinesh Kumar, Rajnish K. Chaturvedi, Sandeep K. Sharma, et Smriti Priya. 2020. « Fast Kinetics of Environmentally Induced α -Synuclein Aggregation Mediated by Structural Alteration in NAC Region and Result in Structure Dependent Cytotoxicity ». *Scientific Reports* 10 (1): 18412. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75361-6>.
- Stefanova, Nadia, Zoe Puschban, Pierre-Olivier Fernagut, Emmanuel Brouillet, François Tison, Markus Reindl, Kurt A. Jellinger, Werner Poewe, et Gregor K. Wenning. 2003. « Neuropathological and Behavioral Changes Induced by Various Treatment Paradigms with MPTP and 3-Nitropropionic Acid in Mice: Towards a Model of Striatonigral Degeneration (Multiple System Atrophy) ». *Acta Neuropathologica* 106 (2): 157-66. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0717-y>.
- Stram, Amanda R., et R. Mark Payne. 2016. « Post-Translational Modifications in Mitochondria: Protein Signaling in the Powerhouse ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (21): 4063-73. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2280-4>.
- Strickley, Robert G. 2004. « Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations ». *Pharmaceutical Research* 21 (2): 201-30. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23>.
- Subramaniam, Srinivasa. 2020. « Exaggerated Mitophagy: A Weapon of Striatal Destruction in the Brain? ». *Biochemical Society Transactions* 48 (2): 709-17. <https://doi.org/10.1042/BST20191283>.
- Sun, Fei, Xia Huo, Yujia Zhai, Aojin Wang, Jianxing Xu, Dan Su, Mark Bartlam, et Zihe Rao. 2005. « Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II ». *Cell* 121 (7): 1043-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>.
- Szeto, Samuel S. W., Stacey N. Reinke, Brian D. Sykes, et Bernard D. Lemire. 2007. « Ubiquinone-Binding Site Mutations in the *Saccharomyces Cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Generate Superoxide and Lead to the Accumulation of Succinate ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 27518-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700601200>.
- Tang, Chengyuan, Juan Cai, Xiao-Ming Yin, Joel M. Weinberg, Manjeri A. Venkatachalam, et Zheng Dong. 2021. « Mitochondrial Quality Control in Kidney Injury and Repair ». *Nature Reviews. Nephrology* 17 (5): 299-318. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00369-0>.
- Teng, Miaomiao, Wentao Zhu, Dezhen Wang, Jin Yan, Suzhen Qi, Min Song, et Chengju Wang. 2018. « Acute Exposure of Zebrafish Embryo (*Danio Rerio*) to Flutolanil Reveals Its Developmental Mechanism of Toxicity via Disrupting the Thyroid System and Metabolism ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 242 (Pt B): 1157-65. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.092>.
- Teplova, Vera V., Konstantin N. Belosludtsev, et Alexey G. Kruglov. 2017. « Mechanism of Triclosan Toxicity: Mitochondrial Dysfunction Including Complex II Inhibition,

- Superoxide Release and Uncoupling of Oxidative Phosphorylation ». *Toxicology Letters* 275 (juin): 108-17. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.004>.
- Terron, Andrea, Anna Bal-Price, Alicia Paini, Florianne Monnet-Tschudi, Susanne Hougaard Bennekou, EFSA WG EPI1 Members, Marcel Leist, et Stefan Schildknecht. 2018. « An Adverse Outcome Pathway for Parkinsonian Motor Deficits Associated with Mitochondrial Complex I Inhibition ». *Archives of Toxicology* 92 (1): 41-82. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2133-4>.
- Tsang, V. H. M., T. Dwight, D. E. Benn, G. Y. Meyer-Rochow, A. J. Gill, M. Sywak, S. Sidhu, et al. 2014. « Overexpression of MiR-210 Is Associated with SDH-Related Pheochromocytomas, Paragangliomas, and Gastrointestinal Stromal Tumours ». *Endocrine-Related Cancer* 21 (3): 415-26. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0519>.
- Tseng, Po-Lin, Wei-Hsuan Wu, Tsung-Hui Hu, Chih-Wei Chen, Hung-Chi Cheng, Chien-Feng Li, Wen-Hui Tsai, et al. 2018. « Decreased Succinate Dehydrogenase B in Human Hepatocellular Carcinoma Accelerates Tumor Malignancy by Inducing the Warburg Effect ». *Scientific Reports* 8 (1): 3081. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21361-6>.
- Van Vranken, Jonathan G., Daniel K. Bricker, Noah Dephoure, Steven P. Gygi, James E. Cox, Carl S. Thummel, et Jared Rutter. 2014. « SDHAF4 Promotes Mitochondrial Succinate Dehydrogenase Activity and Prevents Neurodegeneration ». *Cell Metabolism* 20 (2): 241-52. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.012>.
- Walker, David W., Petr Hájek, Julien Muffat, Dan Knoepfle, Stephanie Cornelison, Giuseppe Attardi, et Seymour Benzer. 2006. « Hypersensitivity to Oxygen and Shortened Lifespan in a Drosophila Mitochondrial Complex II Mutant ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44): 16382-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607918103>.
- Wang, Honglei, Zhen Meng, Fasheng Liu, Liquan Zhou, Meile Su, Yunlong Meng, Shouhua Zhang, Xinjun Liao, Zigang Cao, et Huiqiang Lu. 2020. « Characterization of Boscalid-Induced Oxidative Stress and Neurodevelopmental Toxicity in Zebrafish Embryos ». *Chemosphere* 238 (janvier): 124753. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124753>.
- Wang, Xinhe, Katelyn Becker, Nathan Levine, Michelle Zhang, Andrew P. Lieberman, Darren J. Moore, et Jiyan Ma. 2019. « Pathogenic Alpha-Synuclein Aggregates Preferentially Bind to Mitochondria and Affect Cellular Respiration ». *Acta Neuropathologica Communications* 7 (1): 41. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0696-4>.
- Wu, Siyu, Lili Lei, Mengting Liu, Yang Song, Shibo Lu, Dan Li, Huahong Shi, Kathleen M. Raley-Susman, et Defu He. 2018. « Single and Mixture Toxicity of Strobilurin and SDHI Fungicides to *Xenopus Tropicalis* Embryos ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 153 (mai): 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.045>.
- Xiao, Mengtao, Hui Yang, Wei Xu, Shenghong Ma, Huaipeng Lin, Honguang Zhu, Lixia Liu, et al. 2012. « Inhibition of α -KG-Dependent Histone and DNA Demethylases by Fumarate and Succinate That Are Accumulated in Mutations of FH and SDH Tumor Suppressors ». *Genes & Development* 26 (12): 1326-38. <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>.
- Xiao, Peng, Wenhua Li, Jinfang Lu, Yang Liu, Qiulan Luo, et He Zhang. 2021. « Effects of Embryonic Exposure to Bixafen on Zebrafish (*Danio Rerio*) Retinal Development. » *Ecotoxicology and Environmental Safety* 228 (novembre): 113007. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113007>.
- Yamada, Tomoya, Samuel M. Cohen, et Brian G. Lake. 2021. « Critical evaluation of the human relevance of the mode of action for rodent liver tumor formation by activators of the constitutive androstane receptor (CAR) ». *Critical Reviews in Toxicology* 51 (5): 373-94. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1939654>.
- Yang, Jing, Yi Zhou, Yanchun Li, Wanye Hu, Chen Yuan, Shida Chen, Gaoqi Ye, et al. 2022. « Functional Deficiency of Succinate Dehydrogenase Promotes Tumorigenesis and Development of Clear Cell Renal Cell Carcinoma through Weakening of Ferroptosis ». *Bioengineered* 13 (4): 11187-207. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2062537>.

- Yang, Y., S. Z. Qi, J. Y. Chen, Y. Liu, M. Teng, et C. J. Wang. 2016. « Toxic Effects of Bromothalonil and Flutolanil on Multiple Developmental Stages in Zebrafish ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97 (1): 91-97. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1833-4>.
- Yang, Yang, Fengshou Dong, Xingang Liu, Jun Xu, Xiaohu Wu, Suzhen Qi, Wenxian Liu, et Yongquan Zheng. 2018. « Thifluzamide Affects Lipid Metabolism in Zebrafish (Danio Reio) ». *The Science of the Total Environment* 633 (août): 1227-36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.302>.
- Yang, Yang, Fengshou Dong, Xingang Liu, Jun Xu, Xiaohu Wu, et Yongquan Zheng. 2020. « Thifluzamide Induces the Toxic Effects on Zebrafish (Danio Reio) via Inhibition of Succinate Dehydrogenase (SDH) ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 265 (Pt B): 115031. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115031>.
- Yang, Yang, Wenxian Liu, Dongzhi Li, Le Qian, Bin Fu, et Chengju Wang. 2017. « Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide ». *Chemosphere* 183 (septembre): 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.055>.
- Yang, Yang, Suzhen Qi, Donghui Wang, Kai Wang, Lizhen Zhu, Tingting Chai, et Chengju Wang. 2016. « Toxic Effects of Thifluzamide on Zebrafish (Danio Reio) ». *Journal of Hazardous Materials* 307 (avril): 127-36. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.055>.
- Yang, Zhao, Bing Zhuan, Ying Yan, Simin Jiang, et Tao Wang. 2016. « Roles of Different Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Hypoxia-Induced Pulmonary Vasoconstriction ». *Cell Biology International* 40 (2): 188-95. <https://doi.org/10.1002/cbin.10550>.
- Yanicostas, Constantin, et Nadia Soussi-Yanicostas. 2021. « SDHI Fungicide Toxicity and Associated Adverse Outcome Pathways: What Can Zebrafish Tell Us? » *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22): 12362. <https://doi.org/10.3390/ijms222212362>.
- Yao, Hongzhou, Xiao Xu, Ying Zhou, et Chao Xu. 2018. « Impacts of Isopyrazam Exposure on the Development of Early-Life Zebrafish (Danio Reio) ». *Environmental Science and Pollution Research International* 25 (24): 23799-808. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2449-5>.
- Yao, Hongzhou, Jianping Yu, Ying Zhou, Qingqing Xiang, et Chao Xu. 2018. « The Embryonic Developmental Effect of Sedaxane on Zebrafish (Danio Reio) ». *Chemosphere* 197 (avril): 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.046>.
- Yoshida, Toshinori, Naoki Ikemi, Yukiko Takeuchi, Koichi Ebino, Sayuri Kojima, Yuko Chiba, Nobuaki Nakashima, Hisao Kawakatsu, Machiko Saka, et Takanori Harada. 2012. « A Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study of Cyflumetofen, a Novel Acaricide, in Rats. » *The Journal of Toxicological Sciences* 37 (1): 91-104. <https://doi.org/10.2131/jts.37.91>.
- Yu, Huilin, Junhui Zhang, Yinghong Chen, Juan Chen, Yang Qiu, Yan Zhao, Honghao Li, Shengyao Xia, Shiguo Chen, et Jiabin Zhu. 2022. « The Adverse Effects of Fluxapyroxad on the Neurodevelopment of Zebrafish Embryos ». *Chemosphere* 307 (Pt 1): 135751. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135751>.
- Yuan, Mingrui, Wenhua Li, et Peng Xiao. 2021. « Bixafen Causes Cardiac Toxicity in Zebrafish (Danio Reio) Embryos. » *Environmental Science and Pollution Research International* 28 (27): 36303-13. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13238-5>.
- Zhuang, Zhengping, Chunzhang Yang, Felipe Lorenzo, Maria Merino, Tito Fojo, Electron Kebebew, Vera Popovic, Constantine A. Stratakis, Josef T. Prchal, et Karel Pacak. 2012. « Somatic HIF2A Gain-of-Function Mutations in Paraganglioma with Polycythemia ». *The New England Journal of Medicine* 367 (10): 922-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205119>.

11.2 Rapports d'évaluation

Benzovindiflupyr

ECHA (European Chemicals Agency), 2014. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of benzovindiflupyr. CLH-O-0000001412-86-28/F. Adopted on 4 December 2014. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzovindiflupyr. *EFSA Journal* 2015; 13(3):4043, doi: [10.2903/j.efsa.2015.4043](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4043).

EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzovindiflupyr. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

France, 2014. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance benzovindiflupyr prepared by the rapporteur Member State France in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, January 2014. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

France, 2015. Revised Draft Assessment Report (DAR) on benzovindiflupyr, February 2015. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Bixafen

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bixafen. *EFSA Journal* 2012; 10 (11):2917. 87 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2012.2917](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2917).

EFSA (European Food Safety Authority), 2012c. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bixafen.

United Kingdom, 2011. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance bixafen prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, July 2011.

United Kingdom, 2012. Final Addendum to Draft Assessment Report on bixafen, compiled by EFSA, July 2012.

Boscalid

European Commission, 2008. Review report for the active substance boscalid. Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 22 January 2008 in view of the inclusion of boscalid in Annex I of Council Directive 91/414/EEC. SANCO/3919/2007-rev.5, 21 January 2008.

Germany, 2002. Draft assessment report on the active substance boscalid prepared by the rapporteur Member State Germany in the framework of Council Directive 91/414/EEC, November 2002.

Germany, 2006. Addendum to the draft assessment report on the active substance boscalid prepared by the rapporteur Member State Germany in the framework of Council Directive 91/414/EEC, May 2006.

Slovakia, 2018. Draft renewal assessment report on the active substance boscalid prepared by the rapporteur Member State Slovakia under Regulation (EC) No 1107/2009, November 2018. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Carboxine

ECHA (European Chemicals Agency), 2017. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of carboxin. CLH-O-0000001412-86-180/F. Adopted on 5 December 2017. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carboxin. *EFSA Journal* 2010; 8(10):1857, 65 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2010.1857](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1857)

United Kingdom, 2006. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance carboxin prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, March 2006.

United Kingdom, 2009. Additional Report to the Draft Assessment Report on the active substance carboxin prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Commission Regulation (EC) No 33/2008, December 2009.

United Kingdom, 2010. Final Addendum to the Draft Assessment Report and Additional Report on carboxin, compiled by EFSA, July 2010.

Cyflumetofen

ECHA (European Chemicals Agency), 2017. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of cyflumetofen. CLH-O-0000001412-86-183/F. Adopted on 5 December 2017. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyflumetofen. *EFSA Journal* 2012;10(1):2504, 77 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2012.2504](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2504)

EFSA (European Food Safety Authority), 2012b. Peer review report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyflumetofen. Available online: www.efsa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for the active substance cyflumetofen in light of confirmatory data. *EFSA Journal* 2016; 14(12):4635, 20 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2016.4635](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4635)

Netherlands, 2010. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance cyflumetofen prepared by the rapporteur Member State the Netherlands in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, November 2010.

Netherlands, 2011. Final addendum to the Draft Assessment Report on cyflumetofen compiled by EFSA, October 2011. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Netherlands, 2016. Addendum to the assessment report (vol. 3) on cyflumetofen, confirmatory data, January 2016. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

WHO (World Health Organization), 2015. Pesticide residues in food - 2014: toxicological evaluations / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Rome, Italy, 16–25 September 2014. Disponible en ligne: www.who.int

Fluopyram

ECHA (European Chemicals Agency), 2014. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of fluopyram. CLH-O-

0000001412-86-46/F. Adopted on 4 December 2014. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram.

EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3052. 76 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2013.3052](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3052).

Germany, 2011. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance fluopyram, prepared by the rapporteur Member State Germany in the framework of Directive 91/414/EEC, August 2011.

Germany, 2012. Final Addendum to Draft Assessment Report on fluopyram, compiled by EFSA, September 2012.

Flutalonil

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flutolanil. *The EFSA Journal* (2008), 6 (7):RN-126, 1–63 doi:[10.2903/j.efsa.2008.126r](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.126r)

Finland, 2005. Draft assessment report on the active substance flutolanil prepared by the rapporteur Member State Finland in the framework of Council Directive 91/414/EEC, May 2005.

Finland, 2008. Final addendum to the draft assessment report on the active substance flutolanil prepared by the rapporteur Member State Finland in the framework of Council Directive 91/414/EEC, compiled by EFSA, January 2008.

Netherlands, 2018. Draft assessment report on the active substance flutolanil prepared by the Member State the Netherlands in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, August 2018. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Fluxapyroxad

ECHA (European Chemicals Agency), 2018. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of fluxapyroxad. CLH-O-0000001412-86-254/F. Adopted on 30 November 2018. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluxapyroxad (BAS 700 F).

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluxapyroxad (BAS 700 F). *EFSA Journal* 2012; 10 (1):2522. [90 pp.] doi:[10.2903/j.efsa.2012.2522](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2522).

United Kingdom, 2011a. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance BAS 700 F (fluxapyroxad) prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, January 2011.

United Kingdom, 2011b. Final Addendum to the Draft Assessment Report on BAS 700 F (fluxapyroxad), compiled by EFSA, October 2011.

Isofetamid

Belgium, 2014. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance isofetamid prepared by the rapporteur Member State Belgium in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, October 2014.

Belgium, 2015. Revised Draft Assessment Report (DAR) on isofetamid, August 2015. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2015a. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance isofetamid. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2015b. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance isofetamid. *EFSA Journal* 2015, 13(10):4265, 130 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2015.4265](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4265)

Isopyrazam

ECHA (European Chemicals Agency), 2020. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of isopyrazam. CLH-O-000006915-65-01/F. Adopted on 10 December 2020. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012a. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance isopyrazam.

EFSA (European Food Safety Authority), 2012b. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance isopyrazam *EFSA Journal* 2012; 10(3):2600. 110 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2012.2600](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2600).

EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Technical report on the outcome of the consultation with Member States, the applicant and EFSA on the pesticide risk assessment for isofetamid in light of confirmatory data. *EFSA supporting publication* 2018: 15(4):EN-1403. 23 pp. doi:[10.2903/sp.efsa.2018.EN-1403](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1403)

United Kingdom, 2010. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance isopyrazam prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, May 2010.

United Kingdom, 2012. Final Addendum to Draft Assessment Report on isopyrazam, compiled by EFSA, February 2012.

Penflufen

ECHA (European Chemicals Agency), 2018. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of penflufen. CLH-O-000001412-86-233/F. Adopted on 15 October 2018. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penflufen. *EFSA Journal* 2012; 10(8): 2860, 30 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2012.2860](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2860)

EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penflufen. *EFSA Journal* 2016; 14(11):4604, 24 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2016.4604](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4604)

United Kingdom, 2011. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance penflufen prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, August 2011. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

United Kingdom, 2015. Revised Draft Assessment Report (DAR) on penflufen prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, July 2015. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

United Kingdom, 2016. Revised Draft Assessment Report (DAR) on penflufen prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, August 2016. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Penthiopyrad

ECHA (European Chemicals Agency), 2015. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of penthiopyrad CLH-O-0000001412-86-78/F. Adopted 4 December 2015. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penthiopyrad.

EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penthiopyrad. *EFSA Journal* 2013; 11 (2):3111. 144 pp. doi:[10.2903/j.efsa.2013.3111](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3111).

EFSA (European Food Safety Authority), 2022. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for the active substance penthiopyrad in light of confirmatory data submitted. *EFSA Journal* 2022; 20(1):7037, 18 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7037>

United Kingdom, 2012. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance penthiopyrad prepared by the rapporteur Member State the United Kingdom in the framework of Directive 91/414/EEC, January 2012.

United Kingdom, 2013. Final Addendum to Draft Assessment Report on penthiopyrad, compiled by EFSA, January 2013.

Pydiflumetofen

ECHA (European Chemicals Agency), 2019. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonized classification and labelling at EU level of pydiflumetofen. CLH-O-0000001412-86-271/F. Adopted 15 March 2019. Disponible en ligne: www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2019a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pydiflumetofen. *EFSA Journal* 2019;17(10):5821, 25 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5821>

EFSA (European Food Safety Authority), 2019b. Peer review report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pydiflumetufen. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

France, 2017. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance pydiflumetofen prepared by the rapporteur Member State France in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, July 2017. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

France, 2018. Revised Draft Assessment Report (DAR) on pydiflumetofen prepared by the rapporteur Member State France in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009, September 2018. Disponible en ligne: www.efsa.europa.eu

Sedaxane

ECHA (European Chemicals Agency), 2019. Committee for Risk Assessment (RAC) Opinion proposing harmonized classification and labelling at EU level of sedaxane. CLH-O-0000001412-86-280/F. Adopted 15 March 2019. Disponible en ligne : www.echa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sedaxane, June 2012.

EFSA (European Food Safety Authority, 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance sedaxane. *EFSA Journal* 2013; 11(1):3057. [76 pp.] doi:[10.2903/j.efsa.2013.3057](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3057).

France, 2011. Draft Assessment Report (DAR) on the active substance sedaxane prepared by the rapporteur Member State France in the framework of Directive 91/414/EEC, May 2011.

France, 2012. Final Addendum to Draft Assessment Report on sedaxane, compiled by EFSA, June 2012.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail
Connaître, évaluer, protéger

2019-SA-0202

Décision N° 2019-12-333

AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

Décide :

Article 1^{er}.- L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

L'Anses lance une nouvelle auto-saisine visant à actualiser les données de la littérature scientifique publiées depuis l'approbation des substances fongicides de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) afin d'identifier si des éléments nouveaux pourraient, d'une part, nécessiter une actualisation de l'avis et du rapport du groupe d'expertise collective¹ et, d'autre part, justifier une modification des évaluations menées au niveau européen sur les substances de la famille des SDHI.

1.2 Contexte de l'autosaisine

Après l'alerte d'un collectif de scientifiques, l'Anses avait mandaté en mai 2018 un groupe d'expertise collective en urgence pour déterminer si « les informations et hypothèses scientifiques apportées par les auteurs [de la tribune ...] apportent ... des éléments en faveur d'expositions et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées ». L'avis de l'agence pris sur le fondement de cette expertise a été publié en janvier 2019¹.

Par ailleurs, l'Anses a informé et lancé un appel à la vigilance auprès des autorités européennes et nord-américaines et auprès des autres Etats Membres, et a saisi l'Inserm afin que la question des SDHI soit prise en compte dans le cadre de son expertise collective en cours relative à l'impact des pesticides.

¹ AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) ». 15 janvier 2019

ANSES/PR19/02/01 (version c) – code Error : ANSES/PCE/0630

1 / 2

De plus, L'Anses s'est autosaisie sur les risques cumulés pour les consommateurs en relation avec une exposition aux SDHI. Les résultats sont attendus en mars 2020.

L'Anses a également favorisé l'émergence et financé des projets de recherche et, via les dispositifs de surveillance coordonnés par la phytopharmacovigilance, cherche à détecter d'éventuels effets sanitaires des SDHI pouvant être observés sur le terrain.

Suite à cela, l'Anses a identifié différentes données ou études récemment publiées, parmi lesquelles la publication de Benit *et al.* dans Plos One, qui devront être analysées. Le rapport d'expertise collective de l'Inserm susmentionné devra également être pris en compte.

Pour répondre à l'auto-saisine, un groupe de travail (GT) ad hoc sera constitué à partir des viviers d'experts de l'agence (collectifs existants et viviers de personnes compétentes). Les conclusions de ce groupe seront validées par les CES référents.

1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Les questions suivantes seront examinées :

- L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances ? A cet égard, une attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI ;

L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances ?

- Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? Dans l'affirmative, des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

Les conclusions finales devront être rendues dans un délai de 12 mois, un avis intermédiaire sur la nécessité d'une actualisation de l'avis du GECU de janvier 2019 est attendu dans un délai de 6 mois

Article 2.- Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

Fait à Maisons-Alfort, le 06 DEC. 2019



Dr Roger Genet
Directeur général

Annexe 2 : Revue systématique de la littérature

Le cadrage de la recherche bibliographique ainsi que les mots clés ont été définis par les membres du GT. La première question de la saisine portant sur l'analyse des effets critiques avec une attention particulière aux mécanismes toxiques pour la mitochondrie, les mots clés listés dans le tableau ci-dessous ont été sélectionnés par les membres du GT pour la requête bibliographique.

Tableau 63: Liste des mots-clés utilisés pour la requête bibliographique

Identité (incluant les numéros CAS)	Mécanisme d'action	Effets critiques
{Succinate dehydrogenase inhibit*} {SDH inhibit*} Sdhi {complex II inhibit*} benzovindiflupyr bixafen boscalid carboxin fluopyram flutolanil fluxapyroxad isofetamid isopyrazam penflufen penthiopyrad pydiflumetofen sedaxane 1072957-71-1 581809-46-3 188425-85-6 5234-68-4 658066-35-4 66332-96-5 875915-78-9 881685-58-1 494793-67-8 183675-82-3 1228284-64-7	apopto* necro* autophag* senescen* {Oxidative stress} {reactive oxygen species} ros mitotoxi* metaboli* toxic* lethal sublethal {cell death} hypox* prolif* epigen* succinate respi* pharmacokinetics mitochondria {Respiratory chain} {Complex II} {Complex 2}	neurotoxic* brain neuron neurodegenerative parkinson's striatum {Substantia nigra} dopaminergic motricity alzheimer's amyloid tau tauopathy cognitive memory {Amyotrophic lateral } sclerosis neuroinflammation astrocyte astrogliosis microglia microgliosis huntington cardiotoxic* heart hepatotoxic* liver nephrotoxic*

874967-67-6		kidney pancreas diabetes {Metabolic syndrome} gut {GI tract} {Enteric nervous system} olfactory eye skin cancer thyroid* repro*
-------------	--	---

La requête a été réalisée sur deux bases de données : Pubmed (recherche sur « Title/Abstract » et « Text ») et Scopus (recherche sur « TITLE-ABS-KEY ») entre le 22 décembre 2020 et le 13 janvier 2021, sans limite de date.

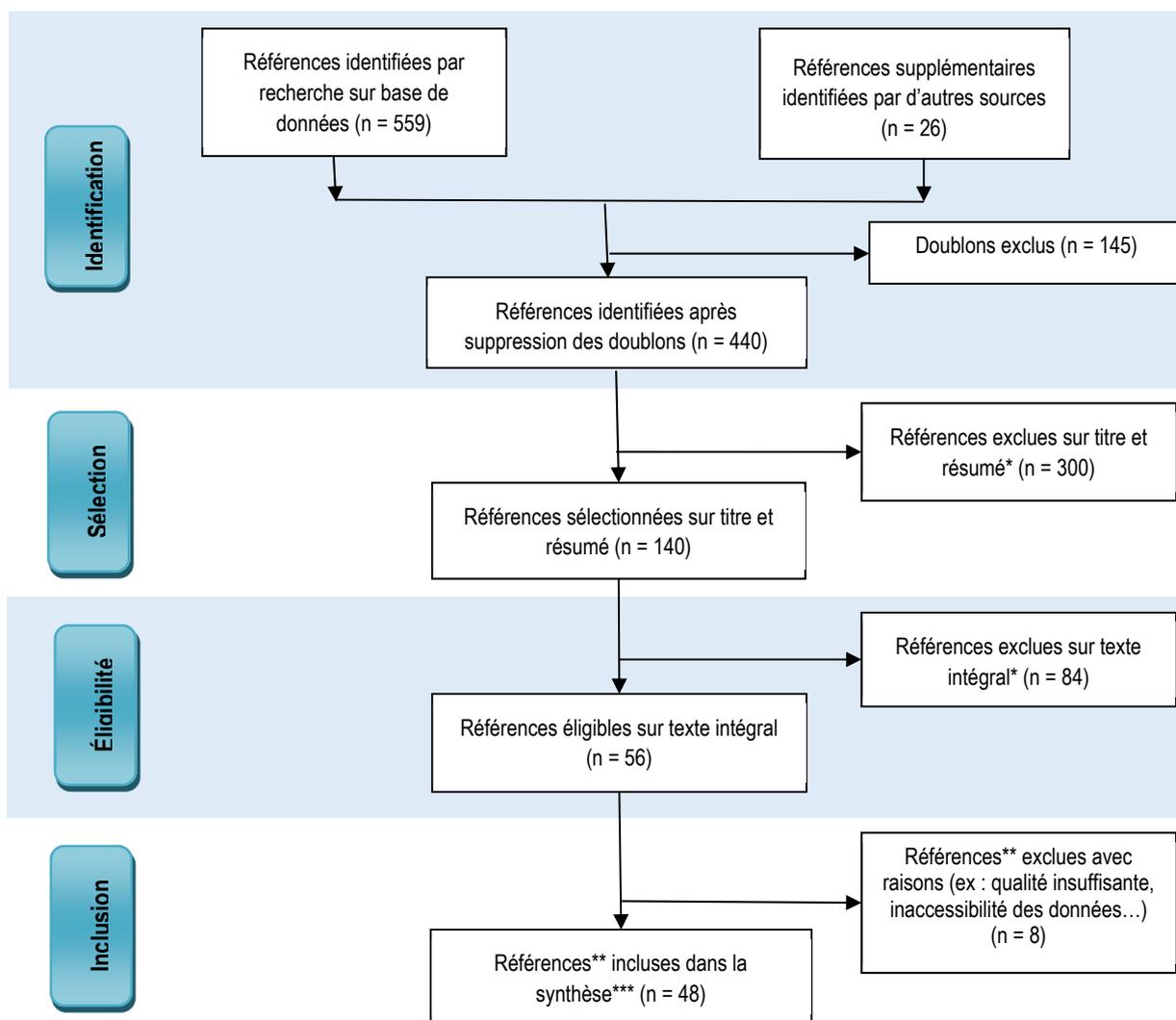
Une actualisation de la recherche bibliographique a été réalisée le 22 juillet 2022 avec les mêmes mots clés. Il est à noter que le cyflumetofen (acaricide) qui n'apparaissait pas dans les mots clés de la requête initiale car celle-ci se focalisait sur les fongicides SDHI, a également été inclus dans cette mise à jour (recherche incluant cyflumetofen et son numéro CAS sans limitation de date). En plus de cette requête bibliographique, l'expertise INSERM (2021) sur les fongicides SDHI a été prise en compte. Par conséquent, les publications identifiées dans la littérature et mentionnées dans l'expertise INSERM n'ont pas été revues spécifiquement par le GT. Il s'agit de 26 publications.

Au total avec les deux requêtes, et après dédoublement, 440 publications ont été identifiées.

La sélection de chaque référence bibliographique sur la base du titre et du résumé a été réalisée par un binôme (membre du GT et/ou agent de l'Anses) en aveugle. Ont été exclues les publications réalisées sur végétaux et champignons, les publications relatives à des données d'efficacité agronomique, les publications analysant des stratégies thérapeutiques en médecine humaine (en particulier traitement anticancéreux) ainsi que les publications ne faisant aucune référence à une inhibition mitochondriale. Cette sélection a abouti à l'exclusion de 300 publications. Cent quarante publications ont été jugées pertinentes sur la base du titre et du résumé.

L'évaluation du texte intégral a conduit à 56 références éligibles. Les phases de sélection, d'éligibilité et d'inclusion des publications ont été discutées collégalement en GT.

Au final, sur la base de cette recherche bibliographique, 48 publications ont été retenues dans le rapport.



* si utile, préciser les raisons d'exclusions ou encore le nombre de références exclues par raison d'exclusion

** si pertinent selon les besoins de la méthode d'expertise, rapporter le nombre d'études à la place du nombre de références

*** expliciter s'il s'agit d'une synthèse qualitative ou quantitative ou éventuellement deux synthèses séparées.

Figure 21 : Diagramme de flux³⁶

³⁶ D'après Gedda M. (2015). Traduction française des lignes directrices PRISMA pour l'écriture et la lecture des revues systématiques et des méta-analyses. *Kinésithérapie* 15(157):39-44. [doi:10.1016/j.kine.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.kine.2014.11.004)

Annexe 3 : Outils d'analyse de fixation des niveaux de confiance pour les VTR à seuil

			ÉVALUATEUR 1		ÉVALUATEUR 2	
			Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation	Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation
Critères	Sous-critères	Critères d'attribution des notes (adaptés pour l'expertise SDHI)	Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur	Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur
Substance						
N° CAS						
Type de VTR construite : durée d'application, voie						
Corpus de données	Quantité et qualité	Jugement d'experts en lien avec les requis réglementaires				
Choix de l'effet critique Type d'effet : [à compléter]	Nature de l'effet	Jugement d'experts. - Modification d'un paramètre biologique (enzyme ou concentration hormonale par exemple) --> 1 ou 2 - Effet fonctionnel --> 3 ou 4 - Lésion histologique --> 5				
	Convergence des études	Jugement d'experts. <u>A titre d'exemple, pour la construction d'une VTR chronique :</u> - Une seule étude mettant en évidence l'effet critique. Les autres études ne le mettent pas en évidence alors qu'elles sont conçues de telle manière qu'elles devraient pouvoir détecter cet effet --> 1 - Quantité adéquate mais quelques limitations --> 2 ou 3 - Plusieurs études convergent --> 4 ou 5				
	MoA (mode d'action) (chez l'animal et chez l'Homme)	<u>Lorsque l'effet est déterminé chez l'animal :</u> - MoA inconnu --> 3 - Connaissance incomplète du MoA chez l'animal et/ou chez l'Homme --> 4 - MoA connu chez l'animal ou/et connu (partiellement ou pas) chez l'Homme --> 5				
	Transposabilité animal --> Homme	<u>Lorsque l'effet est déterminé chez l'animal :</u> - Transposition par défaut, mais doute quant à la pertinence de cette transposition --> 1				

		<ul style="list-style-type: none"> - Transposition par défaut --> 2 - Données chez l'animal mais pas chez l'Homme, mais effet plausible --> 3 - Similarité des effets et de la toxicocinétique qualitativement entre l'animal et l'Homme mais pas quantitativement --> 4 - Toxicocinétique et effets identiques chez l'Homme et l'animal --> 5 				
	Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"		Moyenne des notes attribuées aux 3 sous-critères			
Hypothèse de construction	À seuil par défaut	Dans le cas des effets non cancérogènes, l'hypothèse de construction est à seuil par défaut. Ce n'est pas considéré comme une source d'incertitudes.				
Choix de l'étude (ou des études) clé Référence(s) : [citer la référence]	Qualité de l'étude	Jugement d'experts				
	Durée	<p><u>Dans le cas où la durée de l'étude est différente de la durée pour laquelle est construite la VTR :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Aucune étude de durée adaptée à disposition pour permettre de valider l'utilisation de cette étude de durée non adéquate --> 1 - Présence d'informations montrant que la substance ne s'accumule pas ; que les effets ne sont pas dépendants de la durée ; que les effets n'apparaissent qu'à la suite de l'exposition lors d'une fenêtre de sensibilité de courte durée ; ou pertinence de l'utilisation de l'étude soutenue par des données d'extrapolation voie-à-voie sur la base d'études de durée adaptée ; données suggérant une progression limitée des effets en fonction du temps --> entre 2 et 4 (jugement d'expert ; ces cas correspondent à l'application d'un UFS de 3) - Existence d'étude(s) de durée adaptée permettant de confirmer la pertinence de l'utilisation d'une étude de durée non adaptée --> 3 ou 4 <p><u>A titre d'exemple pour la construction d'une VTR chronique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Étude subchronique, aucune autre étude subchronique ni chronique --> 1 - Durée intermédiaire (entre subchronique et chronique) ; ou étude subchronique et effet irréversible --> 2 à 4 (jugement d'expert) 				

		- Durée similaire (chronique) -->5				
	Confiance pour le critère "choix de l'étude clé"		Moyenne des notes attribuées aux 2 sous-critères			
Choix du PoD	BMD/BMDL, NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul	- NOAEL seul ou LOAEL seul --> 1 - Existence du couple LOAEL/NOAEL --> 2 ou 3 en fonction du choix des doses, du nombre de doses, de l'écart entre les doses, de la présence et de la qualité de la relation dose-réponse, etc. -Existence du couple BMD/BMDL --> 4 ou 5 en fonction du nombre de doses testées, de la compréhension de la relation dose-réponse, etc.				
Ajustements	Temporel	Correspond au passage d'une durée discontinue à continue. Il est considéré que ce n'est pas source d'incertitude.				
	Allométrique	L'ajustement allométrique n'étant jamais fait dans les dossiers réglementaires, ce paramètre n'a pas été considéré pour établir un niveau de confiance dans le cadre de ces travaux.				
Choix UF	UF _A (variabilité animal - homme)	Ce sous-critère n'a pas été considéré pour établir un niveau de confiance dans le cadre de ces travaux, la valeur attribuée pour ce facteur d'incertitude étant une valeur par défaut (valeur de 10).				
	UF _H (variabilité inter-individuelle)	Ce sous-critère n'a pas été considéré pour établir un niveau de confiance dans le cadre de ces travaux, la valeur attribuée pour ce facteur d'incertitude étant une valeur par défaut (valeur de 10).				
	UF _L	Aucun niveau de confiance n'est attribué à ce facteur, car l'incertitude qui y est liée est prise en compte dans le paramètre "choix de la dose critique".				
	UF _S	Aucun niveau de confiance n'est attribué à ce facteur, car l'incertitude qui y est liée est prise en compte dans le paramètre "durée" du "choix de l'étude clé".				
	UF _D	Aucun niveau de confiance n'est attribué à ce facteur, car l'incertitude qui y est liée est prise en compte dans le paramètre "corpus de données".				
Niveaux de confiance	de	Niveau de confiance global	Moyenne des notes de chaque critère, chaque critère ayant le même poids sauf le critère « choix de l'effet critique » qui présente un poids double (Anses, 2017)			

Annexe 4 : Principales propriétés physico-chimiques des pesticides SDHI

Tableau 64 : Données de physico-chimie des SDHI considérés dans l'expertise (source conclusions de l'EFSA)

Nom des substances	Poids moléculaire (g/mol)	Log Kow	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Pression de vapeur (Pa)	Constante de Henry (Pa.m ³ /mol)	pKa
Benzovindiflupyr	398,2	4,3	0,98	3,2 x 10 ⁻⁹	1,3 x 10 ⁻⁶	-
Bixafen	414,21	3,3	0,49	4,6 x 10 ⁻⁸	3,89 x 10 ⁻⁵	-
Boscalid	343,21	2,96	4,6	7,2 x 10 ⁻⁷	5,18 x 10 ⁻⁵	-
Carboxin	235,3	2,3	134	2 x 10 ⁻⁵	3,2 x 10 ⁻⁵	< 0,5
Cyflumetofen	447,45	4,3	0,028	< 5,9 x 10 ⁻⁶	< 9,4 x 10 ⁻²	-
Fluopyram	396,72	3,3	16	1,2 x 10 ⁻⁶	2,98 x 10 ⁻⁵	-
Flutolanil	323,2	3,17	8,01	4,1 x 10 ⁻⁷	1,65 x 10 ⁻⁵	-
Fluxapyroxad	381,31	3,13	3,44	2,7 x 10 ⁻⁹	3,028 x 10 ⁻⁷	-5,52 à 12,58
Isofetamid	359,48	2,5	5,33	4,2 x 10 ⁻⁷	1,5 x 10 ⁻⁵	-
Isopyrazam	359,4	Syn: 4,1 Anti: 4,4	Syn: 1,05 Anti: 0,55	Syn: 2,4 x 10 ⁻⁷ Anti: 2,2 x 10 ⁻⁸	Syn: 1,9 x 10 ⁻⁴ Anti: 3,7 x 10 ⁻⁵	-
Penflufen	317,41	3,3	11	4,1 x 10 ⁻⁷	1,19 x 10 ⁻⁵	-
Penthiopyrad	359,4	4,43	1,375 (pH7)	6,43 x 10 ⁻⁶	7,66 x 10 ⁻³	10
Pydiflumetofen	426,7	3,8	1,5	1,84 x 10 ⁻⁷	1,5 x 10 ⁻⁴	-
Sedaxane	331,4	3,3	14	6,5 x 10 ⁻⁸	4,0 x 10 ⁻⁶	-

Annexe 5 : Présentation des positions divergentes

Ce rapport d'expertise collective a été validé lors de la réunion du groupe de travail « SDHI » des 14, 17 et 18 avril 2023. Des experts ont présenté des positions divergentes sur certaines parties du rapport. Ces positions sont détaillées ci-dessous.

Avis divergent au sujet de la DJA du bixafen

Laurence Huc, Anthony Lemarié

L'évaluation des VTR a été conduite par les experts et expertes selon des modalités partagées par toutes et tous : examen approfondi des dossiers réglementaires, synthèse des principaux résultats, analyse des NOAEL et des LOAEL selon la prise en compte des effets délétères, notamment ceux présentant un lien avec la cible des SDHI : la SDH.

Cette méthode répond aux objectifs de la saisine :

*« L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances. A cet égard, une **attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI** ;*

*L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un **impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances** ?*

*Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? dans l'affirmative, **des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen** ».*

Ainsi, deux experts ont travaillé sur le bixafen. Le rapport détaillé a été envoyé à la coordination du GT l'été 2022. Puis les VTR de cette substance ont été examinées lors de 3 séances de GT, puis validées le 19 septembre 2022.

A l'issue de l'envoi du rapport au CES VSR et Phyto, des commentaires de la part des membres du CES ont conduit à une relecture du texte en GT et à la non-prise en compte d'un effet délétère reconnu comme pouvant découler d'une atteinte de la SDH, le *phéochromocytome*. Cette pathologie cancéreuse est liée, entre autres, à une inhibition partielle de la SDH, entraînant une accumulation du succinate, oncométabolite, qui induit un état de pseudohypoxie et d'hyperméthylation des histones et de l'ADN, à l'origine de la cancérisation des cellules. Le phéochromocytome (et les paragangliomes) est un cancer neuroendocrinien rare qui touche 1 personne/ 100 000 d'après l'INCA. Or, nous avons identifié cette pathologie dans le dossier réglementaire du bixafen, qui survient dès la plus faible dose testée.

A raison de la faible significativité statistique et de la non-reconnaissance d'une manifestation physiopathologique évoquant l'inhibition de la SDH, les CES ont émis des doutes sur la pertinence de la prise en compte le phéochromocytome comme effet adverse. Etant donné qu'il s'agit d'un cancer rare, nous estimons que l'analyse statistique proposée n'est pas adaptée à la prise en compte d'un effet biologique rare mais réel. Ainsi, nous n'approuvons pas la remise en cause de cet effet délétère par les CES ainsi que son rejet par les autres membres du GT non démissionnaires lors d'un vote le 15/02/2023. Nous estimons que la VTR

proposée n'est pas suffisamment protectrice des effets cancérigènes pouvant se manifester à très faibles doses de bixafen.

De plus, du fait de la forte capacité du bixafen à inhiber la SDH humaine *in vitro* (Bénit et al : IC50 Bixafen SCCR $0.34 \pm 0.12 \mu\text{M}$ *homo sapiens* versus SCCR $0.07 \pm 0.06 \mu\text{M}$ *botrytis cinerea*), il est probable que cela explique l'inexistence d'une relation dose-effet : si une dose faible de bixafen est suffisante pour bloquer la 50-100% de la SDH et d'entraîner une accumulation de succinate, les effets ne peuvent pas être plus forts à des doses 10 à 100 fois supérieures.

Nous retranscrivons ici l'argumentaire validé par le GT avant l'envoi aux CES de la version du rapport de décembre 2022.

Dérivation de la DJA (version du 13 dec 2022)

Description de la DJA

La DJA actuelle de 0,02 mg/kg pc/j a été déterminée sur la base de la NOAEL observée chez le rat femelle [en raison d'un sacrifice prématuré des mâles, une autre étude chez les rats mâle a été réalisée] (50 ppm : 2-2,8 mg/kg pc/j) dans une étude chronique de 2 ans d'exposition, avec l'application d'un facteur d'incertitude total de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle, chez l'humain). En comparaison, les NOAEL chez la souris après 18 mois d'exposition sont plus élevées (6,7-8,6 mg/kg pc/j).

Les effets critiques observés à cette NOAEL, et leurs caractères délétères ou non, ont été discutés. Ils incluent i) une augmentation du poids du foie (sans lésions significatives associées), associée à une augmentation non statistiquement significative du taux de cholestérol et à une diminution statistiquement significative du taux de bilirubine, et parfois de certaines activités enzymatiques hépatiques (aspartate aminotransférase), et ii) des altérations thyroïdiennes colloïdales, considérées comme non statistiquement significatives à cette dose d'exposition. De plus, des tumeurs folliculaires thyroïdiennes (2/59 femelles) apparaissent à la plus forte dose de 2 000 ppm (soit 117 mg/kg pc/j), conduisant à la NOAEL de 300 ppm (17,4 mg/kg pc/j), dose à laquelle aucune tumeur des cellules folliculaires n'est rapportée (58 femelles). Le GT note cependant que des carcinomes thyroïdiens (2/60 femelles (3,4%)) sont également rapportés à la dose de 50 ppm (équivalent à **2,81 mg/kg pc/j**), bien que non considérés comme reliés au traitement dans le dossier réglementaire. Aucune tumeur des cellules folliculaires n'est rapportée dans le groupe contrôle non exposé (57 femelles).

Le GT a principalement discuté des observations de phéochromocytomes rapportés comme bénins (3) et d'adénomes de la zone fasciculaire (2) à la NOAEL (50 ppm) établie dans le dossier réglementaire chez le rat mâle. Deux (1 phéochromocytome et 1 adénome) ou trois (2 phéochromocytomes et 1 adénome) tumeurs surrenaliennes bénignes ont été observées aux deux doses les plus élevées (300 et 2000 ppm), respectivement, pour chaque groupe de 60 rats. Un (1/60) phéochromocytome malin a été rapporté à la dose la plus élevée (2000 ppm). Aucune tumeur surrenalienne n'a en revanche été observée dans le groupe non exposé (0/60). L'attention du GT s'est particulièrement portée sur cette observation en considérant la rareté et la difficulté d'induire expérimentalement des tumeurs surrenaliennes chez les rongeurs. Certains experts soulignent que les phéochromocytomes sont des effets délétères rapportés chez des sujets présentant des mutations dans un des gènes SDHx.

Au regard des observations des tumeurs thyroïdiennes chez les femelles et phéochromocytomes chez les mâles, le GT retient la LOAEL de 50 ppm (au lieu d'une NOAEL à 50 ppm, telle que statuée au niveau européen) à partir de l'étude de cancérogénèse chez le rat. Cela conduit à **une DJA de 0,007 mg/kg/j** à la place de 0,02 mg/kg/j.

Niveaux de confiance

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (ANSES 2017) :

- la nature et la qualité dans le corpus de données : au moins 2 espèces (rat et souris) ont été étudiées dans de nombreuses études de 2 ans et 18 mois.
- le choix de l'effet critique et le mode d'action : les effets critiques identifiés sont des tumeurs thyroïdiennes et surrenaliennes observées à la dose de 50 ppm. Ces effets, observés uniquement chez le rat, sont considérés par défaut comme transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas connu.
- le choix de l'étude clé : l'étude clé est une étude de 2 ans d'exposition journalière chez des rates dans l'alimentation jugée de bonne qualité (70 ou 80 femelles traitées par dose, 4 doses incluant un contrôle négatif) et d'une durée adaptée pour dériver une DJA.
- le choix du point de départ : après discussion, les experts ont jugé que la dose de 50 ppm correspondait à une LOAEL chez le rat (2-2,8 mg/kg pc/j). Une NOAEL n'est donc pas disponible.

Conclusions :

Nous avons proposé de maintenir notre argumentation initiale en retenant les tumeurs thyroïdiennes et les phéochromocytomes comme effet adverse.

Elle n'a été retenue par la majorité du GT. C'est pourquoi nous formulons cet avis divergent. La valeur de la DJA retenue par la majorité du GT est de 0,02 mg/kg pc/j. Ici, nous proposons d'établir **DJA à 0,007 mg/kg pc/j**, soit une dose 2,8 fois inférieure que nous estimons plus protectrice pour une exposition alimentaire chronique au bixafen.

Avis divergent sur l'ARfD du cyflumetofen

Laurence Huc, Anthony Lemarié

L'évaluation des VTR a été conduite par les experts et expertes selon des modalités partagées par toutes et tous : examen approfondi des dossiers réglementaires, synthèse des principaux résultats, analyse des NOAEL et des LOAEL selon la prise en compte des effets délétères, notamment ceux présentant un lien avec la cible des SDHI : la SDH.

Cette méthode répond aux objectifs de la saisine :

*« L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à **faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances**. A cet égard, une **attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la familles des SDHI** ;*

*L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils **des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances** ?*

*Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? dans l'affirmative, **des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen** ».*

Ainsi, trois expert.e.s ont travaillé sur le cyflumetofen, le seul SDHI examiné étant utilisé comme acaricide et le seul SDHI ayant la propriété d'être un pro-pesticide, c'est-à-dire que c'est son métabolite qui inhibe la SDH. Le rapport détaillé a été envoyé à la coordination du GT le 16 août 2022.

Un rapport plus succinct répondant aux exigences de rédaction homogène entre tous les SDHI a également été produit et intégré au rapport. Puis les VTR de cette substance ont été examinées lors de 4 séances de GT, puis validées le 19 septembre 2022.

A l'issue de l'envoi du rapport au CES VSR et Phyto, des commentaires de la part des membres du CES ont conduit à une relecture du texte en GT et à la non-prise en compte d'un effet délétère reconnu comme pouvant découler d'une atteinte mitochondriale, *la micro-ophtalmie*. Cette maladie liée au mauvais développement de l'œil, est une malformation congénitale rare qui touche 1 enfant/ 10 000 d'après les chiffres d'ORPHANET. Or, nous avons identifié cette pathologie dans le dossier réglementaire du cyflumetofen, qui survient dès la plus faible dose testée.

A raison de la faible significativité statistique et de la non-reconnaissance d'une manifestation physiopathologiques évoquant l'inhibition de la SDH, les CES ont émis des doutes sur la pertinence de la prise en compte de la micro-ophtalmie comme effet adverse. Etant donné qu'il s'agit d'une maladie congénitale rare, nous estimons que l'analyse statistique proposée n'est pas adaptée à la prise en compte d'un effet biologique rare mais réel. Ainsi, nous n'approuvons pas la remise en cause de cet effet délétère par les CES ainsi que son rejet par les autres membres du GT non démissionnaires lors d'un vote le 15/02/2023. Nous estimons que la VTR proposée n'est pas suffisamment protectrice des effets oculaires pouvant se manifester à très faibles doses lors de l'exposition fœtale au cyflumetofen.

Nous retranscrivons ici l'argumentaire validé par le GT avant l'envoi aux CES de la version du rapport de décembre 2022.

Dérivation de l'ARfD du cyflumetofen (version décembre 2022)

Description de l'ARfD

A ce jour, il n'y a pas d'ARfD établie.

Étant donné les effets observés dans l'étude de toxicité prénatale, avec une tératogénicité observée à la plus faible dose testée (50 mg/kg pc/j) au niveau du développement oculaire, le GT considère qu'une ARfD doit être fixée.

Plus précisément, dans l'étude sur le rat, les auteurs du rapport d'étude passent sous silence l'apparition de deux malformations oculaires majeures et irréversibles. A la dose la plus faible (50 mg/kg pc/j), un fœtus présente une microphthalmie (œil de taille réduite) et un autre présente des replis rétiniens que les auteurs estiment liés à la préparation des tissus sans qu'aucune image ou analyse plus poussée ne permette de valider leur hypothèse. En l'absence d'éléments contraires, il apparaît donc que deux fœtus présentent des malformations oculaires majeures qui impactent gravement la fonction visuelle. Ces modifications sont permanentes et signes d'une organogénèse profondément perturbée. Le fait qu'il n'y ait pas d'effet dose réponse n'est pas un argument suffisant pour éliminer un effet direct du cyflumetofen et ne pas présenter les résultats de l'analyse statistique correspondante. En effet, sur des fœtus de rat, l'évaluation de la taille des globes oculaires et l'analyse de la structure rétinienne exigent une expertise fine et des examens attentifs. En l'absence d'étude plus approfondie et spécifique de l'œil chez les fœtus, il est important d'attirer l'attention sur le fait qu'il est possible de ne pas détecter ces malformations.

Par précaution et à la vue des effets oculaires observés avec d'autres SDHI, il conviendrait de considérer la valeur de 50 mg/kg pc/j comme une LOAEL pour la tératogénicité chez le rat à partir de laquelle il serait possible d'établir une ARfD.

Ainsi, le GT recommande d'établir une **ARfD à 0,17 mg/kg pc**, après prise en compte d'un facteur d'incertitude total de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle, chez l'humain, 3 pour l'extrapolation LOAEL - NOAEL).

Niveaux de confiance

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (ANSES 2017) :

- la nature et la qualité dans le corpus de données : plusieurs études conduites chez plusieurs espèces (rat, lapin), respectant les lignes directrices de l'OCDE, sont disponibles.
- le choix de l'effet critique et le mode d'action : les troubles oculaires chez les petits identifiés à la dose la plus faible peuvent révéler une altération du développement de la rétine. Les troubles oculaires sont des événements rares. Une seule étude met en évidence cet effet. Celui-ci est transposable à l'humain. Le mode d'action est partiellement connu (voir section 8.5).
- le choix de l'étude clé : l'étude choisie est la seule pour laquelle des troubles oculaire ont été identifiés à la dose la plus faible. Celle-ci est d'une durée adaptée à la dérivation d'une ARfD.
- le choix du point de départ : Les troubles oculaires surviennent chez les petits à la plus faible dose. Ainsi, la NOAEL chez les progénitures n'est pas déterminable. Il n'existe donc qu'une LOAEL pour cet effet dans cette étude.

Conclusions :

Deux propositions ont été faites en GT :

- De maintenir notre argumentation initiale en retenant la microophtalmie comme effet adverse
- Ou, dans l'impossibilité de reconnaître cet effet comme adverse à cause de l'analyse statistique, appliquer un facteur d'incertitude supplémentaire sur la VTR retenue (pour un autre effet adverse à une dose supérieure, ici le retard d'ossification au niveau du sternum), en raison d'une augmentation du risque de développer une micro-ophtalmie irréversible pour la population vulnérable qu'est le fœtus. En effet, appliquer un facteur d'incertitude selon la méthode classique invisibilise l'effet adverse rare mais réel à la plus petite dose testée. Du fait, par ailleurs, que le cyflumetofen présente un certain nombre d'éléments évoquant la perturbation endocrinienne, nous jugeons que l'application de facteur d'incertitude actuelle n'est pas protectrice pour les populations sensibles (femmes enceintes dont l'exposition professionnelle ou riveraine constitue un danger pour le fœtus). Ce facteur d'incertitude supplémentaire est employé au Canada pour l'exposition aux substances anti-parasitaires.

Aucune n'a été retenue par la majorité du GT. C'est pourquoi nous formulons cet avis divergent. La valeur d'ARfD retenue par la majorité du GT est de 0,5 mg/kg pc/j. Ici, nous proposons d'établir l'**ARfD à 0,17 mg/kg pc/j**.

Qualité des études de toxicité chronique du Fluopyram

Laurence Huc, Anthony Lemarié

Objectif :

L'évaluation des VTR a été conduite par les experts et expertes selon des modalités partagées par toutes et tous : examen approfondi des dossiers règlementaires, synthèse des principaux résultats, analyse des NOAEL et des LOAEL selon la prise en compte des effets délétères, notamment ceux présentant un lien avec la cible des SDHI : la SDH.

Cette méthode répond aux objectifs de la saisine :

*« L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à **faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques** des substances. A cet égard, une **attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale** des substances actives de la familles des SDHI ;*

*L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un **impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances** ?*

*Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? dans l'affirmative, **des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen** ».*

Méthode :

Deux rapporteur.rices ont analysé les dossiers relatifs à l'homologation de fluopyram et ont présenté leurs conclusions à l'ensemble des membres du GT

Résultats :

On note une forte mortalité chez les animaux contrôles et exposés au fluopyram au cours de l'expérimentation 24 mois rat utilisée pour l'évaluation de la toxicité chronique et la cancérogénicité.

Discussion :

La majorité des membres du GT SDHI a choisi de garder cette étude pour fixer la DJA, faute de mieux. Voici ce qui est rapporté dans l'expertise :

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (OCDE 453), conduite chez le rat par voie orale.

Analyse critique du GT

Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé, pendant 104 semaines, des aliments contenant 0, 30, 150 ou 750/375 ppm de fluopyram chez les mâles ou 0, 30, 150 ou 1500 ppm chez les femelles. Cela correspond à des expositions de 0 ; 1,2 ; 6,0 ou 29 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,68 ; 8,6 ou 89 mg/kg pc/j pour les femelles. Concernant le groupe de mâles exposés à la 750 ppm de fluopyram, cette dose a été diminuée à la 85^{ème} semaine pour une dose de 375 ppm jusqu'à la 104^{ème} semaine.

Les effets critiques sont les suivants :

- une augmentation statistiquement significative du poids absolu du foie, associée à des changements biochimiques et histologiques (hypertrophie, foyers éosinophiles).

- des lésions histologiques de la thyroïde : hypertrophie folliculaire et altération de la colloïde.
- des anomalies histologiques des reins (hypertrophie et dilatation tubulaire, néphropathie chronique progressive, gouttelettes hyalines) chez les rats mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 150 ppm et 30 ppm.

Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 1,2 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie est de 0,012 mg/kg pc/j.

Cette étude montre une mortalité totale inexplicée observée en cours d'étude (270 animaux sur 560, soit 48%). Cette mortalité est considérée, dans le rapport d'évaluation européenne, comme significativement liée au traitement chez les mâles à la plus haute dose. La mortalité chez les femelles, bien que significativement augmentée à la plus faible dose, a été jugée dans le dossier réglementaire non liée au traitement en raison de l'absence de relation dose-réponse.

Tableau : Mortalité et taux de survie après 104 semaines (étude chez le rat, réalisée avec le fluopyram ; partie cancérogénicité)

Sex	Males				Femelles			
Dose (ppm)	0	30	150	750/375	0	30	150	1500
Mortalité totale (% mortalité)	37 (61,7)	44 (73,3)	34 (56,7)	49 (81,7)	19 (31,7)	32 (53,3)	25 (41,7)	30 (50,0)
Taux de survie ajustée (%) ^a	37,8	26,7	22,3	19,9*	68,3	46,7*	60,4	51,0

^a : test de Kaplan-Meier ; * : $p \leq 0,05$

L'étude de cancérogénicité chez la souris a également été examinée par le GT pour évaluer si elle pouvait être utilisée pour dériver la DJA. Les doses d'exposition étant plus élevées que celles utilisées dans l'étude chez le rat, le GT ne recommande pas de se baser sur ces observations car cela conduirait à une DJA moins protectrice.

Par conséquent, le GT maintient l'étude de cancérogénicité chez le rat comme point de départ pour la DJA, comme retenu dans le dossier réglementaire. Cependant, le GT propose d'appliquer à la NOAEL de 1,2 mg/kg pc/j, un facteur d'incertitude de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour prendre en compte la mauvaise qualité de l'étude due à la mortalité élevée chez le rat). Ceci conduit à une DJA, finalement retenue par le GT, de 0,004 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global **faible** a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (ANSES 2017) :

- **la nature et la qualité du corpus de données** : il existe des études long terme chez les rats et souris. L'utilisation de doses très différentes rend difficile la comparaison de ces études et l'interprétation des résultats.

- **le choix de l'effet critique et le mode d'action** : les effets critiques sont des changements biochimiques et/ou histopathologiques au niveau du foie, de la thyroïde et des reins. Des effets similaires sont observés dans l'étude de cancérogénicité chez la souris mais à des doses d'exposition plus élevées. Ces effets sont considérés par défaut transposables à l'humain. Le mode d'action n'est pas précisé.
- **le choix de l'étude clé** : bien qu'étant d'une durée adaptée pour élaborer une DJA, cette étude montre une mortalité inexplicée en cours d'étude (270 animaux sur 560, soit 48%).
- **le choix du point de départ** : la dérivation de la DJA repose sur un couple LOAEL/NOAEL.

Discussion et justification de l'avis divergent

La mortalité observée respecte la ligne directrice OCDE 453 et le Guidance Document No. 116 (7) à la limite de l'acceptabilité.

« L'arrêt de l'étude doit être envisagé lorsque le nombre de survivants dans les groupes recevant la dose la plus faible ou dans le groupe témoin tombe en dessous de 25 %. »

La survie du groupe recevant la dose la plus faible est à 26,7%, ce qui est effectivement acceptable d'un point de vue réglementaire. Le pays rapporteur, l'Allemagne, la juge acceptable.

Pourtant, pour une question aussi cruciale que la cancérogénicité du fluopyram, cette étude n'aurait pas dû servir à la demande d'homologation de la substance. D'une part, le fluopyram fait l'objet de 2 publications de la firme Bayer montrant qu'il est cancérigène chez la souris et chez le rat.

D'autre part, la ligne directrice N°451 OCDE impose de tester la cancérogénicité d'une substance avec une expérimentation de 24 mois chez le rat et de 18 mois chez la souris. Le fait de produire une étude qui est à la limite de l'acceptabilité ne donne pas réellement de choix aux experts pour fixer une VTR, sachant que l'effet délétère utilisé ne devrait pas être la mortalité, mais bien une pathologie qui doit être la plus bénigne possible, et pas uniquement sur des animaux « survivants ».

Selon les critères d'éthique de la conduite d'une étude scientifique *in vivo* chez les rongeurs, une baisse de la viabilité de 10% des animaux au sein d'un même groupe entraîne un arrêt de l'expérimentation en cours, avant tout pour des questions de bien-être animal. De plus, constatant cette mortalité, le pétitionnaire a changé la dose maximale tolérée en cours d'expérimentation, pratique qui serait jugée frauduleuse en recherche académique.

Ainsi, en tant que scientifique, je ne peux pas :

- 1) accepter la fiabilité de l'étude pour fixer une norme
- 2) cautionner une absence de classement de fluopyram comme cancérigène par l'ECHA sur la base des études médiocres présentes dans le dossier réglementaire.

Je souhaite également exprimer ici un point d'alerte sur l'actuelle « non-cancérogénicité du fluopyram » qui est basée sur des expérimentations irrecevables scientifiquement.

Avis divergent sur la DJA du fluopyram

Jérôme Henri, Sylvie Bortoli et Anthony Lemarié

I Rappel de l'avis majoritaire du GT qui permet de contextualiser

I.A Description de la DJA (retenue par le GT et reprise pour des éléments de contexte)

L'étude clé utilisée pour l'élaboration de la DJA est une étude combinée de toxicité chronique et de cancérogénicité (OCDE 453), conduite chez le rat par voie orale. Dans cette étude, des groupes de 60 animaux de chaque sexe ont consommé, pendant 104 semaines, des aliments contenant 0, 30, 150 ou 750/375 ppm de fluopyram chez les mâles ou 0, 30, 150 ou 1500 ppm chez les femelles. Cela correspond à des expositions de 0 ; 1,2 ; 6,0 ou 29 mg/kg pc/j pour les mâles et 0 ; 1,68 ; 8,6 ou 89 mg/kg pc/j pour les femelles. Concernant le groupe de mâles exposés à la 750 ppm de fluopyram, cette dose a été diminuée à la 85ème semaine pour une dose de 375 ppm jusqu'à la 104ème semaine.

Les effets critiques sont les suivants : une augmentation statistiquement significative du poids absolu du foie, associée à des changements biochimiques et histologiques (hypertrophie, foci foyers éosinophiles), des lésions histologiques de la thyroïde : hypertrophie folliculaire et altération de la colloïde, des anomalies histologiques des reins (hypertrophie et dilatation tubulaire, néphropathie chronique progressive, gouttelettes hyalines) chez les rats mâles.

La LOAEL et la NOAEL pour ces effets critiques sont de 150 ppm et 30 ppm. Le point de départ pour l'élaboration de la DJA est la NOAEL chez les mâles de 1,2 mg/kg pc/j. Après application d'un facteur d'incertitude de 100 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle), la DJA établie [par le GT] est de 0,012 mg/kg pc/j.

I.B Analyse critique de l'étude par le GT

Cette étude montre une mortalité totale inexplicée observée en cours d'étude (270 animaux sur 560, soit 48%). Cette mortalité est considérée, dans le rapport d'évaluation européenne, comme significativement liée au traitement chez les mâles à la plus haute dose. La mortalité chez les femelles, bien que significativement augmentée à la plus faible dose, a été jugée dans le dossier réglementaire non liée au traitement en raison de l'absence de relation dose-réponse.

Tableau : Mortalité et taux de survie après 104 semaines dans cette étude

Sexe	Male				Femelle				
	Dose (ppm)	0	30	150	750/375	0	30	150	1500
Mortalité totale (% mortalité)		37 (61,7)	44 (73,3)	34 (56,7)	49 (81,7)	19 (31,7)	32 (53,3)	25 (41,7)	30 (50,0)
Taux de survie ajustée (%) ^a		37,8	26,7	22,3	19,9*	68,3	46,7*	60,4	51,0

^a : test de Kaplan-Meier ; * : $p \leq 0,05$

L'étude de cancérogénicité chez la souris a également été examinée par le GT pour évaluer si elle pouvait être utilisée pour dériver la DJA. Les doses d'exposition étant plus élevées que celles utilisées dans l'étude chez le rat, le GT ne recommande pas de se baser sur ces observations car cela conduirait à une DJA moins protectrice.

Par conséquent, le GT maintient l'étude de cancérogénicité chez le rat comme point de départ pour la DJA, comme retenu dans le dossier réglementaire. Cependant, le GT propose d'appliquer à la NOAEL de 1,2 mg/kg pc/j, un facteur d'incertitude de 300 (10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 3 pour prendre en compte la mauvaise qualité de l'étude due à la mortalité élevée chez le rat). Ceci conduit à une DJA, finalement retenue par le GT, de 0,004 mg/kg pc/j.

Un niveau de confiance global faible a été attribué à cette DJA en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (ANSES 2017)

II. Enoncé de l'avis divergent

Cet avis minoritaire ne diverge que sur un point vis-à-vis de l'avis majoritaire du GT. **En effet cet avis minoritaire reprend volontiers à son compte l'ensemble des éléments exposés à ce sujet par le GT, à l'exception du facteur d'incertitude de 300 retenu. Cet avis minoritaire propose un facteur d'incertitude de 1000 comme cela a été retrouvé par le passé pour la dérivation de DJA de certains pesticides au niveau européen** (voir tableau 21 de ce document pour exemple : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.4929>).

En effet cet avis minoritaire considère que bien que la viabilité du groupe témoin de rats mâles reste au-dessus des 25% d'acceptabilité (associée à la ligne directrice OCDE 453 « études combinées de toxicité chronique et de cancérogénèse »), cette viabilité reste problématique pour un groupe témoin puisqu'elle est seulement de 37,8%. Si cette faible viabilité du groupe témoin (mâles) est acceptée selon les lignes directrices et n'a pas justifié réglementairement de refaire une étude ou de demander une étude de toxicité chronique à des doses équivalentes dans une troisième espèce, elle pose à minima des considérations éthiques et scientifiques puisque ce groupe contrôle est utilisé (comme référence) dans toutes les comparaisons aux groupes de mâles traités dans cette étude. Cela nuit à ces comparaisons et donc aux interprétations d'une telle étude « témoins » vs. « traités ».

Ainsi la conclusion de cet avis minoritaire revendique un facteur de sécurité additionnel (renforcé par le niveau de confiance faible alloué à l'étude) mais reste dans la mesure de ce qui est pratiqué dans les évaluations européennes (comme référencé plus haut).

La conclusion de cet avis minoritaire se présente donc ainsi :

Appliquer à la NOAEL de 1,2 mg/kg pc/j, un facteur d'incertitude de 1000 : 10 pour la variabilité inter-espèces, 10 pour la variabilité interindividuelle et 10 pour prendre en compte les déficiences que ce groupe témoin entraîne sur l'ensemble des données (non couvertes par les autres facteurs d'incertitude). Conduisant à une DJA de 0,0012 mg/kg pc/j.

Avis divergent sur l'ARfD du penthiopyrad

Laurence Huc, Anthony Lemarié

Dérivation de l'ARfD du penthiopyrad (version décembre 2022)

Description de l'ARfD

L'étude de référence pour l'ARfD est celle sur la toxicité développementale chez le lapin par gavage. Les doses testées sont 0, 25, 75 et 225 mg/kg pc/j. La NOAEL pertinente est de 75 mg/kg pc/j sur la base d'une légère réduction du poids corporel du fœtus chez le lapin. Ainsi, la présente ARfD dérivée de cette NOAEL, est égale à 0,75 mg/kg pc, après application d'un facteur 100 pour tenir compte des variabilités inter et intra-espèces.

Compte tenu du fait que plusieurs SDHI semblent affecter le système visuel et que la SDH a un rôle prépondérant dans la mise en place de celui-ci (voir section 8.5), le GT a porté son attention sur les effets oculaires qui ont été observés dans 2 études.

La première concerne l'étude de toxicité prénatale chez le lapin New Zealand, exposé par gavage à 0, 25, 75 ou 225 mg/kg pc/j. Chez les témoins, 6 fœtus issus de 3 portées différentes avaient les yeux partiellement ouverts, dont un présentant un encéphalocèle (ce qui correspond à la présence de matériel cérébral en dehors de la boîte crânienne). A la dose la plus faible de 25 mg/kg pc/j, 4 fœtus issus de 2 portées différentes, présentaient des yeux partiellement ouverts, dont l'un des 4 présentant une hydrocéphalie et une microphtalmie avec des replis rétinien bilatéraux associés. Des paupières ouvertes signent l'arrêt du développement sur les dernières étapes. Il y a un risque de malformation de l'iris associée. Rien n'est observé aux fortes doses. Il est conclu dans le dossier réglementaire que les malformations des paupières sont dans la gamme des contrôles historiques et donc, sans lien avec le traitement. Cependant, dans une étude pilote réalisée à 0, 250, 500 or 1000 mg/kg pc/j, la présence de 6 fœtus avortés avec des paupières ouvertes avait déjà été rapportée pour la dose à 500 mg/kg pc/j et c'est sur cet effet néfaste que les auteurs ont décidé de la gamme de concentrations utilisée dans les études ultérieures. Il paraît donc important au GT que cet effet soit reconnu comme néfaste à la dose de 25 mg/kg pc/j dans l'étude principale.

Une deuxième étude réalisée chez le rat Wistar par gavage à 0, 62,5, 250 et 1000 mg/kg pc/j, met en évidence chez le groupe témoin 2 fœtus issus de 2 portées différentes avec des yeux de taille réduite. Dans le groupe testé à la dose la plus forte de 1000 mg/kg pc/j, 3 fœtus de 3 portées différentes présentent des yeux de taille réduite. Ces effets néfastes ne sont pas relevés ni commentés dans le dossier réglementaire.

Le GT propose de prendre **25 mg/kg pc/j**, dose associée à des malformations oculaires dans l'étude de toxicité prénatale chez le lapin, comme dose de référence (LOAEL) et d'appliquer un facteur d'incertitude total de 300 (10x10 pour les variabilités inter et intra-espèces et 3 pour l'extrapolation LOAEL – NOAEL). Ainsi, **l'ARfD serait de 0,083 mg/kg pc**.

Niveaux de confiance

Un niveau de confiance global **moyen-fort** a été attribué à cette ARfD en se basant sur différents critères, tels que mentionnés dans le guide méthodologique d'élaboration des VTR de l'Anses (ANSES 2017) :

- la nature et la qualité dans le corpus de données : les études conduites chez plusieurs espèces (rat, lapin) respectent les lignes directrices de l'OCDE.
- le choix de l'effet critique et le mode d'action : les troubles oculaires identifiés à la dose testée la plus faible peuvent révéler une altération du développement de la rétine. **Les troubles oculaires sont des événements rares**. Cependant, le GT note une fréquence plus élevée de ces troubles en présence de penthiopyrad et

ce, à une dose faible chez le lapin. Ces troubles oculaires ont été mis en évidence dans l'étude pilote et l'étude de toxicité développementale chez le lapin, ainsi que dans une étude chez le rat à une dose plus forte. Ces effets sont transposables à l'humain. Le mécanisme d'action est partiellement connu.

- le choix de l'étude clé : l'étude sur développement chez le lapin, retenue comme étude clé, est jugée de bonne qualité et présente une durée adaptée pour dériver une ARfD.
- le choix du point de départ : l'étude a permis d'identifier uniquement une LOAEL, les troubles oculaires survenant chez les petits à la plus faible dose. Ainsi, une NOAEL chez les progénitures n'est pas déterminable dans l'étude clé.

Avis divergent : Toxicité d'organes : foie

Laurence Huc, Anthony Lemarié

Objectif : Les membres du GT, après l'examen de tous les dossiers, ont acté le 14 janvier 2022, de réaliser une analyse transversale des effets toxiques des SDHI. Cette analyse, innovante par rapport à l'évaluation réglementaire substance par substance, visait à expliciter les toxicités d'organes communes ou différentes pour tous les SDHI expertisés. Elles ont donc une importance capitale pour identifier des effets délétères communs à des substances ayant la même cible pharmacologique, la SDH.

Méthode :

Contrairement aux autres chapitres de toxicité d'organes, le chapitre dédié au foie comme organe cible des SDHI n'a pas été l'objet d'une étude systématique de tous les dossiers réglementaires par l'expert en charge de ce travail. Or, comme cela est rapporté dans le chapitre dédié à la thyroïde, tableau 54, le nombre de SDHI conduisant à des atteintes hépatiques est important et aurait mérité une présentation dans le détail des données. De plus, il n'a pas été retenu de prendre en compte la littérature académique sur SDH et foie pour éclairer l'analyse avec les connaissances scientifiques.

Résultat :

Le foie apparaît comme un organe-cible majeur des SDHI.

Cependant, malgré de multiples apports scientifiques des expert.e.s de la SDH sur l'inhibition de la SDH et les dysfonctionnements hépatiques, cela n'a pas permis d'analyser les effets délétères hépatiques au regard de la mitotoxicité, contrairement à l'objet de la saisine.

*« L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à **faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques des substances**. A cet égard, une **attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale des substances actives de la famille des SDHI** ;*

*L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils des éléments suggérant un **impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances** ?*

*Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? dans l'affirmative, **des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen** ».*

Conclusion et justification de l'avis divergent :

1- Présentation lacunaire des effets hépatiques des SDHI

Ce chapitre n'a pas repris le détail des impacts pathologiques des SDHI au niveau hépatique sur la base factuelle du contenu des dossiers réglementaires. Cela entraîne une invisibilisation des effets délétères des SDHI sur le foie.

2- Des atteintes hépatiques souvent jugées « non pertinentes pour l'humain »

De plus, l'analyse des effets des SDHI sur la fonction hépatique reprend essentiellement des éléments de la littérature réglementaire qui aboutit à considérer les atteintes hépatiques observées chez les rongeurs comme étant non pertinentes pour l'humain. L'invocation des

phénomènes « phenobarbital-like » des SDHI par les pétitionnaires invisibilise les effets que pourraient avoir les SDHI sur d'autres cibles que les xénosenseurs CAR ou PXR, à savoir, la SDH en premier lieu.

Enfin, des différences sur les mécanismes de cancérogenèse hépatique chez la souris et chez l'humain sont souvent invoquées dans les dossiers réglementaires, amenant à considérer les effets hépatotoxiques des SDHI comme des « faux-positifs ». Notons encore cependant, qu'une récente étude de 2022 dans *Hepatology* démontre que les atteintes chroniques du foie induisent une baisse de l'expression de SDHA/B chez la souris ET chez les patients humains. Les mécanismes décrits sont conservés dans les 2 espèces, avec une baisse d'expression de SDHA/B qui serait alors favorable à la prolifération des cellules cancéreuses et à la promotion tumorale (Yuan et al. 2022).

- 3- Des publications scientifiques sur la SDH et les atteintes hépatiques non mobilisées pour analyser les données des dossiers réglementaires.

Ce chapitre ne mobilise pas la littérature académique qui relie l'inhibition de la SDH avec la survenue de cancers du foie, ni celle qui relie les SDHI à des atteintes du foie en particulier chez le poisson-zèbre.

De plus, le GT n'a pas eu l'opportunité d'auditionner un.e expert.e en hépatologie, siégeant par exemple dans une société savante, malgré les demandes faites par écrit par un expert démissionnaire, demandes appuyées par plusieurs membres du GT.

Conclusion :

Ainsi, l'approche choisie pour présenter les connaissances sur SDHI et effets hépatiques peut s'avérer biaisée.

Il est vraisemblable que les atteintes hépatiques soient directement liées à la propriété pharmacologique des SDHI de bloquer la SDH. Cette hypothèse n'étant pas formulée dans le rapport, elle fait donc l'objet de cet avis divergent.

Bibliographie

Yuan T, Zhou T, Qian M, Du J, Liu Y, Wang J, et al. 2022. SDHA/B reduction promotes hepatocellular carcinoma by facilitating the deNEDDylation of cullin1 and stabilizing YAP/TAZ. *Hepatology* Baltim Md; doi:10.1002/hep.32621.

Avis divergent : Toxicité d'organes : thyroïde

Laurence Huc, Anthony Lemarié

Objectif : Les membres du GT, après l'examen de tous les dossiers, ont acté le 14 janvier 2022, de réaliser une analyse transversale des effets toxiques des SDHI. Cette analyse, innovante par rapport à l'évaluation réglementaire substance par substance, visait à expliciter les toxicités d'organes communes ou différentes pour tous les SDHI expertisés. Elles ont donc une importance capitale pour identifier des effets délétères communs à des substances ayant la même cible pharmacologique, la SDH.

Méthode :

Le chapitre dédié à la thyroïde comme organe cible des SDHI reprend de façon très détaillé le contenu des dossiers réglementaire.

Résultat :

La thyroïde apparaît comme un organe-cible majeur des SDHI.

Cependant, malgré de multiples apports scientifiques des expert.e.s de la SDH sur l'inhibition de la SDH et ses impacts thyroïdiens, cela n'a pas permis d'analyser les effets délétères thyroïdiens au regard de la mitotoxicité, contrairement à l'objet de la saisine.

*« L'analyse des éléments disponibles ou à venir, notamment les effets critiques, doivent-ils conduire à **faire évoluer les valeurs de référence toxicologiques** des substances. A cet égard, une **attention spécifique sera portée à la toxicité mitochondriale** des substances actives de la famille des SDHI ;*

*L'analyse des résultats de vigilance, de surveillance ou d'études épidémiologiques apportent-ils **des éléments suggérant un impact sanitaire qui n'aurait pas été pris en compte dans l'évaluation des risques relative à ces substances** ?*

*Au regard de ces éléments, des modifications des valeurs de référence toxicologiques des substances actives SDHI sont-elles nécessaires ? dans l'affirmative, **des propositions sont attendues afin qu'elles puissent être portées au niveau européen** ».*

Conclusion et justification de l'avis divergent :

- 1- Des perturbations thyroïdiennes souvent jugées « non pertinentes pour l'humain »

L'analyse des effets des SDHI sur la fonction thyroïdienne reprend essentiellement des éléments de la littérature réglementaire qui aboutit à considérer les atteintes thyroïdiennes observées chez les rongeurs comme étant non pertinentes pour l'humain pour 6 SDHI.

De plus, le GT n'a pas eu l'opportunité d'auditionner un expert toxicologue en perturbation thyroïdienne, Andreas Kortenkamp, malgré les demandes faites par écrit par Laurence Huc en 2020, demandes appuyées par plusieurs membres du GT. Or, cet expert a notamment contribué à évaluer les outils réglementaires pour caractériser la perturbation thyroïdienne, lors d'un *workshop* européen organisé par l'Anses, à l'Anses 29-31 mars 2017 (rapport Kortenkamp et al 2017 DOI:10.2779/921523). Ce *workshop* rassemblait plusieurs expert.e.s internationaux dans le domaine. Il avait pour but de donner des clés d'analyse sur les dossiers réglementaires, notamment quand il s'agissait de prédire la transposabilité des résultats chez l'animal à l'humain. Or, cette expertise, pourtant portée par l'ANSES en 2017, n'a pas du tout été mobilisée pour analyser les dossiers, alors qu'un grand nombre de SDHI sont concernés par les atteintes thyroïdiennes. De plus, ce rapport inclut une analyse des modèles aquatiques, prédictifs pour l'humain.

- 2- Des publications scientifiques sur la SDH et les atteintes thyroïdiennes non mobilisées pour analyser les données des dossiers réglementaires.

Ce chapitre ne mobilise pas, dans une large mesure, la littérature académique qui relie l'inhibition de la SDH avec la survenue de cancers de la thyroïde ou celle qui relie les SDHI à des perturbations thyroïdiennes.

Plus précisément, il existe de la littérature mentionnant les effets des SDHI sur la thyroïde dans les modèles poissons-zèbres. Ces modèles ont un intérêt prédictif souligné par le rapport Kortenkamp 2017. Ces publications sont mentionnées dans le rapport mais non mobilisées pour l'éclairage de l'interprétation des données. Il en est de même sur les connaissances relatives aux altérations de l'activité SDH humaine et la survenue de cancers thyroïdiens. L'hypothèse que les perturbations thyroïdiennes seraient liées au blocage de la SDH n'a pas été retenue par la majorité des membres non démissionnaires du GT en fin d'expertise. Pour information, ces données ont été présentées par l'un des experts membre du GT SDHI le 12 juillet 2021 et rappelées comme étant essentielles par une experte démissionnaire le 15 mars 2022.

D'autres données existent sur le blocage de la SDH et atteintes thyroïdiennes. Le dossier réglementaire du 3NP indique également des tumeurs thyroïdiennes chez le rat. De plus, un autre composé inhibant le complexe II, l'amiodarone, est également responsable de tumeurs thyroïdiennes chez les rongeurs et chez l'humain (Fromenty et al. 1990; Mackie and Shulkin 2005; Saad et al. 2004).

Ainsi, la figure 21 représente les effets des SDHI sur la régulation hormonale thyroïdienne uniquement selon une vision réduite, calquée exclusivement sur les modalités réglementaires des modes d'action.

Conclusion :

L'approche choisie pour présenter les connaissances sur SDHI et effets thyroïdiens peut paraître biaisée.

Ainsi, il est vraisemblable que les effets thyroïdiens soient directement liés à la propriété biochimique des SDHI de bloquer la SDH. Cette hypothèse n'étant pas formulée dans le rapport, elle fait donc l'objet de cet avis divergent.

Notons enfin que les cancers de la thyroïde sont l'objet d'une récente étude indiquant un risque accru chez les jardiniers des espaces verts (de Graaf et al. 2022), les professionnels. Ils pourraient constituer des populations vulnérables aux pathologies thyroïdiennes car plus fortement exposés.

Ainsi, une attention spéciale doit être portée quant aux atteintes observées dans les dossiers réglementaires sur les rongeurs où la non-pertinence pour l'humain est souvent invoquée.

Bibliographie

- de Graaf L, Talibov M, Boulanger M, Bureau M, Robelot E, Lebailly P, et al. 2022. Health of greenspace workers: Morbidity and mortality data from the AGRICAN cohort. *Environ Res* 212:113375; doi:10.1016/j.envres.2022.113375.
- Fromenty B, Fisch C, Berson A, Letteron P, Larrey D, Pessayre D. 1990. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 1377–1384.

- Mackie GC, Shulkin BL. 2005. Amiodarone-induced hyperthyroidism in a patient with functioning papillary carcinoma of the thyroid and extensive hepatic metastases. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 15:1337–1340; doi:10.1089/thy.2005.15.1337.
- Saad A, Falciglia M, Steward DL, Nikiforov YE. 2004. Amiodarone-induced thyrotoxicosis and thyroid cancer: clinical, immunohistochemical, and molecular genetic studies of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 128:807–810; doi:10.5858/2004-128-807-ATATCC

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

Contribution personnelle : Structure du complexe SDH et conservation interespèces

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Bernard Salles

Co-signataires : Sylvie Bortoli, Laurence Huc, Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

L'analyse des réactions biochimiques catalysées par la SDH reposent sur la structure obtenue par radiocristallographie du complexe protéique enrichie des effets induits par des modifications post-traductionnelles des sous-unités, de mutations ponctuelles ou dirigées et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Gènes et séquences

Les gènes codant pour les sous-unités du complexe SDH1 – SDH4 chez les eucaryotes sont conservés dans la diversité des espèces, bien que les séquences d'acides aminés de SDH3 et SDH4 soient beaucoup plus divergentes que celles de SDH1 et SDH2 (Huang *et al.*, 2019). Ce fait illustre la base fonctionnelle dépendante de l'oxydation du succinate qui limite l'évolution de SDH1 et SDH2, contrairement à SDH3 et SDH4, qui sont principalement des protéines d'ancrage à la membrane. En outre, SDH3 et SDH4 ont été déplacés des génomes mitochondriaux vers les génomes nucléaires à plusieurs reprises et ont divergé dans leur séquence (Gray *et al.*, 1999). Cette divergence de séquence au cours de l'évolution indique également une plus grande diversité dans la structure de liaison de l'ubiquinone (Q-site) de la SDH (Huang *et al.*, 2019) ce qui implique des différences d'affinité des inhibiteurs fongicides selon les espèces. En effet le Q-site correspond au site d'interaction des fongicides SDHi dans la région d'interface formée par SDHB, SDHC et SDHD.

L'assemblage des sous-unités matricielles est assisté par quatre facteurs SDHAF : SDHAF1–SDHAF4 (Sharma *et al.*, 2020; Rutter *et al.*, 2010). Ces cofacteurs sont chargés en parallèle sur SDHA et SDHB, tandis que SDHC et SDHD se dimérisent dans la membrane. Les sous-unités solubles s'associent ensuite et se lient finalement au sous-complexe SDHC-SDHD pour former un complexe II complet. L'importance de cette famille de protéines d'assemblage, dans le métabolisme cellulaire normal, se manifeste par l'identification de variants dans SDHAF2 et SDHAF3 chez l'humain qui sont liés au développement de paragangliomes/phéochromocytomes (Dwight *et al.*, 2017).

Deux sites de liaison pour la quinone ont été décrits sur la base de données de structure, l'un du côté matriciel et l'autre du côté de l'espace intermembranaire (IMS) (Sun *et al.*, 2005). D'après des données de structure et de biochimie il est désormais admis que seul le site de la matriciel est catalytiquement pertinent, car le site IMS est trop éloigné du cluster Fe-S pour le transfert d'électrons (Vercellino and Sazanov, 2022).

La comparaison des séquences protéiques des sous-unités indique une forte conservation chez les espèces ce qui est attendu pour une activité biochimique indispensable à la vie cellulaire. Par exemple, ce haut degré de conservation a été rapporté par Bénit *et al.* entre 22 espèces pour les sous-unités SDHB, C et D (Bénit *et al.*, 2019). Si les séquences nucléotidiques et protéiques sont largement conservées, qu'en est-il de la structure du site de liaison des fongicides SDHi ?

Structure du site de liaison des fongicides

La structure cristallographique du Q-site a été déterminée chez les champignons pathogènes avec pour objectif de sélectionner de nouveaux inhibiteurs et d'identifier les modifications responsables d'une résistance à ces fongicides (<https://www.frac.info/knowledge-database/knowledge-database>). Les mutations le plus souvent observées chez des champignons pathogènes résistants à des fongicides SDHi et rapportées d'après les prélèvements en champ concernent *sdhB*:H272Y/R ou P225L/F.

Outre ces données structurales du Q-site chez les champignons pathogènes, des études ont été conduites chez d'autres organismes comme la bactérie *E. coli* (Yankovskaya *et al.*, 2003), le porc (Sun *et al.*, 2005), le poulet (Huang *et al.*, 2005) ou le ver (Shimizu *et al.*, 2012). Les structures récentes d'une forme cristalline améliorée du complexe chez *E. coli* (Maher *et al.*, 2018) ont résolu un certain nombre de différences apparentes entre les structures antérieures d'*E. coli* et l'enzyme mitochondriale (Huang *et al.*, 2021).

La structure cristallographique du complexe II de mitochondries de cœur de porc a été résolue ainsi que celle du complexe en présence du TTFA (2-thenoyltrifluoroacetone), un inhibiteur de la réduction de l'ubiquinone qui se loge dans le Q-site (Sun *et al.*, 2005). Le Q-site est formé par l'hélice 2L (Sdhc : 30-52), l'hélice 2S (SdhD : 45-65) et les sites de liaison des complexes Fe-S (Sdhb : 166-175 et 214-219)

La structure du Q-site du complexe II de poulet en interaction avec six inhibiteurs différents (TTFA, Aptenine A5, flutolanil, carboxin, thiapronil) a été résolue et montre les interactions communes entre les inhibiteurs et leur site de liaison (Huang *et al.*, 2021). Dans tous les cas, un oxygène carbonyle ou hydroxyle de l'inhibiteur interagit par liaison H avec le site Y58 de SdhD et W173 de SdhB. Deux des inhibiteurs sont liés directement au site S39 de SdhC, tandis que deux autres sont liés via une molécule d'eau. Les autres résidus du complexe II de poulet en proximité des inhibiteurs sont *sdhB* :P169/H216, *sdhC* :I27/W32/M36/R43 et *sdhD* :W57 (Fig 1)

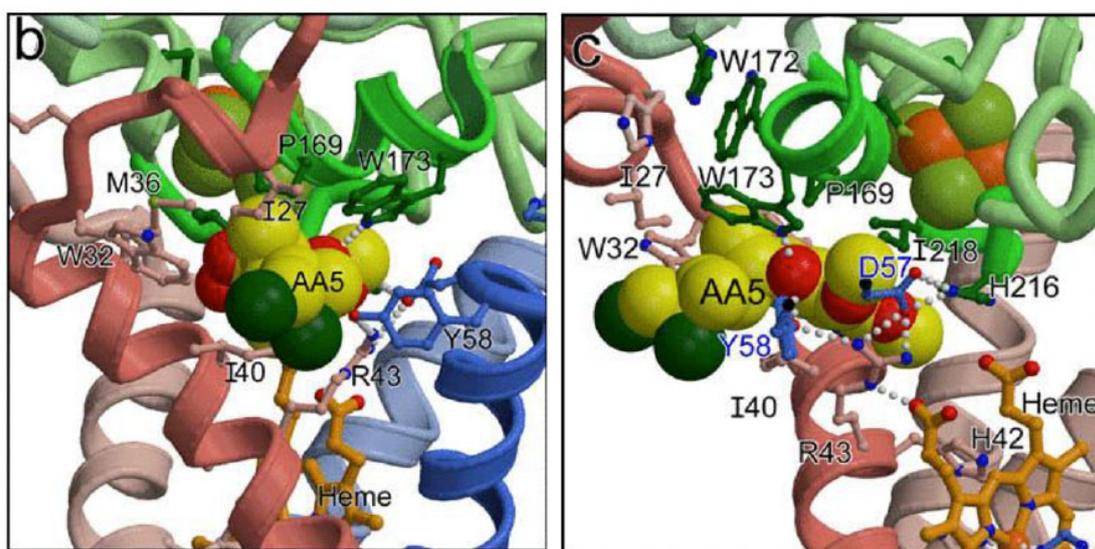


Figure 1 : Structure du Q-site du complexe II du poulet avec la liaison de l'Aptenine A5. La figure C correspond à B avec une rotation de 90° découvrant une vue latérale de l'inhibiteur (figure extraite de (Huang *et al.*, 2021))

Ces positions sont conservées chez la quasi-totalité des organismes comparés en particulier *Escherichia coli*, *Ustilago maydis*, *Candida auris*, *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum*, *Drosophila melanogaster*, être humain. Une cavité distincte accepte le substituant en position 2 du cycle carboxylate dans le cas du flutolanil et les inhibiteurs apparentés. Une poche hydrophobe reçoit une chaîne latérale d'inhibiteurs de longueur intermédiaire. La comparaison des mitochondries et du complexe SQR de *E. coli* montre une rotation des sous-unités d'ancrage membranaire par rapport à la protéine fer-soufre qui modifie la géométrie du Q-site et le schéma de liaison H de SdhB:H216 et SdhD:W57. Cette différence conformationnelle, plutôt qu'une mutation du site actif, peut être responsable de la différence de sensibilité de l'enzyme bactérienne aux inhibiteurs. Les sites des mutations observées chez les champignons pathogènes résistants, sdhB:H272Y/R ou P225L/F, correspondent au site sdhB : H245 et P197 pour la séquence protéique chez l'être humain ou le poulet.

Ainsi, quelques variations de structures peuvent être impliquées pour expliquer des différences d'affinité d'un inhibiteur pour les complexes II de différentes espèces, mais l'architecture du complexe est cependant très conservée des bactéries aux eucaryotes supérieurs (Yankovskaya *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005).

Les variants (mutants)

Les effets de mutations sur l'activité du complexe II peuvent être discutés selon qu'elles portent sur l'une des sous-unités hors des sites de liaison du succinate (SDHA) ou des pesticides (Q-site) ou bien sur des acides aminés en interaction, principalement par liaison hydrogène, avec les inhibiteurs.

Les mutations sur les positions de liaison à l'un des fongicides conduisent à des résistances croisées vis-à-vis d'autres SDHi chez les champignons pathogènes (Wang *et al.*, 2022) mais dans quelques cas induit une augmentation de sensibilité à d'autres fongicides (« negative cross-resistance ») (Leroux *et al.*, 2010). Par exemple, une mutation SdhB :H258Y chez *Tetranychus urticae* confère une résistance au cyenopyrafen et pyflubumide mais renforce la liaison et la toxicité au cyflumetofen (Njiru *et al.*, 2022).

Chez les espèces non cibles les variants du complexe II sont recherchés en rapport avec des pathologies neurologiques ou tumorales indépendamment du site de fixation d'inhibiteurs. Chez l'être humain, des variants sont étudiés depuis une vingtaine d'années et les mutations ou délétions dans les gènes codant pour les sous-unités SDH conduisent à une perte d'activité plus ou moins marquée. Des mutations faux-sens du gène SDHB ont été testées dans des systèmes cellulaires *in vitro* démontrant une baisse plus ou moins marquée de l'activité SDH avec dans quelques cas une diminution de localisation mitochondriale (Kim *et al.*, 2015). Cependant une exception est rapportée avec la mutation SDHB: I127S qui n'a pas d'effet sur la stabilité du complexe SDHA/SDHB, ni sur l'activité mais est associée aux paragangliomes (PGLs), suggérant un autre effet que l'inhibition du transport des électrons sous réserve que l'essai *in vitro* ne conduise pas à un artefact (Kim *et al.*, 2015).

Bibliographie

-
- Bénit, P. *et al.* (2019) Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. *PLOS ONE*, **14**, e0224132.
- Dwight, T. *et al.* (2017) Analysis of SDHAF3 in familial and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *BMC Cancer*, **17**, 497.
- Gray, M.W. *et al.* (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476–1481.
- Huang, L.S. *et al.* (2005) Crystallization of mitochondrial respiratory complex II from chicken heart: a membrane-protein complex diffracting to 2.0 Å. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **61**, 380–387.
- Huang, L.-S. *et al.* (2021) Crystallographic investigation of the ubiquinone binding site of respiratory Complex II and its inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1869**, 140679.
- Huang, S. *et al.* (2019) Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling. *Plant J.*, **98**, 405–417.
- Kim, E. *et al.* (2015) Structural and functional consequences of succinate dehydrogenase subunit B mutations. *Endocr. Relat. Cancer*, **22**, 387–397.
- Leroux, P. *et al.* (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 6615–6630.
- Maher, M.J. *et al.* (2018) Crystal structure of bacterial succinate:quinone oxidoreductase flavoprotein SdhA in complex with its assembly factor SdhE. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115**, 2982–2987.
- Njiru, C. *et al.* (2022) A H258Y mutation in subunit B of the succinate dehydrogenase complex of the spider mite *Tetranychus urticae* confers resistance to cyenopyrafen and pyflubumide, but likely reinforces cyflumetofen binding and toxicity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **144**, 103761.
- Rutter, J. *et al.* (2010) Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, **10**, 393–401.
- Sharma, P. *et al.* (2020) The roles of SDHAF2 and dicarboxylate in covalent flavinylation of SDHA, the human complex II flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 23548–23556.
- Shimizu, H. *et al.* (2012) Crystal structure of mitochondrial quinol–fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **151**, 589–592.
- Sun, F. *et al.* (2005) Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, **121**, 1043–1057.
- Vercellino, I. and Sazanov, L.A. (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 141–161.
- Wang, Q. *et al.* (2022) Molecular Mechanism of *Sclerotinia sclerotiorum* Resistance to Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *J. Agric. Food Chem.*, **70**, 7039–7048.
- Yankovskaya, V. *et al.* (2003) Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science*, **299**, 700–704.

Contribution personnelle : Mutations retrouvées dans les déficits héréditaires isolés en complexe II chez l'humain

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Synthèse réalisée par Fatima Djouadi à partir d'un tableau de Fullerton (2020) [doi: 10.1016/j.ymgme.2020.09.009].

Co-signataires : Sylvie Bortoli, Laurence Huc, Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

Mutations retrouvées dans les déficits héréditaires isolés en complexe II chez l'humain

Gène	nbr de cas	cDNA	conséquence prédite: protéine
SDHA	5	c.1351C > T (het)	p.(Arg451Cys)
	1	c.1A>C	perte initiation
		c.1571C > T	p.(Ala524Val)
	1	c.248C > T	p.(Ala83Val) / p. (Ala83_Gln104del)
		c.356G > A	p.(Trp119*)
	1	c.91C > T	p.(Arg31*)
		c.565T > G	p.(Cys189Gly)
	1	c.117del	p.(Asn40Thrfs*18)
		c.221dup	p.(Leu74Phefs*9)
	1	c.771_772del	p.(Gly258Leufs*62)
		c.1065_1260del	p.(Gly356Serfs*2)
	1	c.1065-3C > A (hom)	splicing
	1	c.64-2A > G (hom)	splicing
	17	c.1664G > A (hom)	p.(Gly555Glu)
2	c.1660C > T (hom)	p.(Arg554Trp)	
1	c.1523C > T	p.(Thr508Ile)	
	c.1526C > T	p.(Ser509Leu)	
SDHB	7	c.143A > T (hom)	p.(Asp48Val)
	1	c.143A > T (hom)	p.(Asp48Val)
		c.689G > A	p.(Arg230His)
	1	c.143A > T (hom)	p.(Asp48Val)
		c.308T>C	p.(Met103Thr)
	1	c.304G > A (hom)	p.(Ala102Thr)
1	c.769C > G (hom)	p.(Leu257Val)	
SDHD	1	c.205G > A	p.(Glu69Lys)
	1	c.479G > T	p.(*160Leuext*3)
SDHAF1	5	c.164G > C (hom)	p.(Arg55Pro)
	2	c.168G > C (hom)	p.(Gly57Arg)
	3	c.169G > C (hom)	p.(Gly57Arg)
	2	c.170G > A (hom)	p.(Gly57Arg)
	2	c.3G > A (hom)	perte initiation
	1	c.22C > T (hom)	p.(Gln8*)
	1	c.156C > A (hom)	p.(Tyr52*)

het: hétérozygote; hom: homozygote; del: délétion; dup: duplication

Contribution personnelle : Données sur le cyflumetofen

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Laurence Huc

Co-signataire : Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

Les atteintes des organes relevées dans l'ensemble des études expérimentales réalisées chez le rat, la souris, le chien et le lapin sont résumées dans le tableau ci-dessous. Ce tableau résume le nombre de travaux notant des atteintes d'organes sur l'ensemble des expériences conduites.

Tableau faisant la synthèse des effets néfastes rapportés sur les modèles animaux

Atteintes Modèles	Surrénales	Ovaires, Utérus	Reproduction, Développement	Foie	Reins
Rats (n = 7 études)	7/7	6/7	2/2 (études dédiées)	4/7	2/7
Souris (n = 3 études)	3/3			1/3	
Chiens (n = 3 études)	3/3 avec ↑ poids hypophyse, thyroïde, pancréas			1/3	
Lapins (n = 1 étude)	1/1		1/1	1/1	

Toutes les études animales, quel que soit le modèle, montrent une atteinte des surrénales (chez les mâles et femelles) et des ovaires (chez les femelles) avec une hyperplasie de ces organes. Nous nous sommes questionné si ces atteintes étaient liées à une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales. Cette affection rare est due à une perte d'activité variable de certaines enzymes. Ce déficit entraîne une production anormale des hormones par les glandes surrénales (le cortisol et l'aldostérone sont souvent diminués, les androgènes sont souvent augmentés). Par ailleurs, les déséquilibres hormonaux sont souvent associés à une hypertension artérielle. Malheureusement, les études disponibles dans le dossier réglementaire ne comportent pas de dosage hormonal, ni de suivi de la pression artérielle. Des observations complémentaires sont néanmoins disponibles dans la proposition de classification du cyflumetofen déposée par les Pays-Bas en 2016 (The Netherlands - December 2016).

Ainsi, concernant la pression artérielle, une étude en aigu a été menée sur 4 chiens. La pression artérielle a été mesurée 0,5, 1, 3, 6 et 24 heures après l'ingestion d'une dose unique de cyflumetofen. La pression artérielle diastolique et la pression artérielle moyenne 1 heure après l'administration étaient plus élevées dans le groupe traité par le cyflumetofen par rapport

aux témoins. Cependant, les auteurs de l'étude ont jugé que les valeurs étaient restées dans la fourchette des mesures post-administration dans le groupe contrôle et ont conclu que le cyflumetofen n'induisait pas d'effets sur le système respiratoire et cardiovasculaire chez le chien à 2000 mg/kg pc. Cette étude est clairement insuffisante pour exclure l'effet du cyflumetofen sur l'hypertension artérielle. Un suivi de la pression artérielle sur les études de 28 jours aurait été nécessaire. Ceci est regrettable d'autant plus que l'un des premiers symptômes des phéochromocytomes (tumeurs pouvant être liées à l'inhibition de la SDH) est l'hypertension artérielle chez l'humain comme chez le chien (Galac and Korpershoek 2017). Ainsi, nous déplorons que la littérature scientifique (Lenders et al. 2020) sur les effets du blocage de la SDH sur le système corticosurrénalien n'ait pas éclairé l'interprétation des données dans le cadre de l'expertise du dossier règlementaire.

Sur le plan mécanistique, une étude menée chez le rat montre que le cyflumetofen diminue l'expression génique de la lipase hormonosensible (LHS ou Hormone-sensitive lipase, HSL en anglais) dans les surrénales. Même si l'expression génique de la LHS n'informe que partiellement sur l'activité de l'enzyme, les auteurs proposent que la diminution de son expression entraîne une inhibition de l'hydrolyse des esters de cholestérol, conduisant à un dépôt de cholestérol dans les surrénales. Ceci est en cohérence avec l'augmentation des concentrations en cholestérol total, cholestérol libre et cholestérol estérifié dans les surrénales (confirmé par Kraemer et al. avec les souris LHS-/- (Kraemer et al. 2004) mais aussi avec l'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques observées dans les cellules corticales des surrénales. Les auteurs proposent que ce mécanisme soit également impliqué dans les ovaires, expliquant les mêmes atteintes histologiques dans les cellules interstitielles des ovaires. Cependant, aucun dosage de cholestérol n'est disponible pour soutenir cette conclusion.

Les auteurs ont également observé une augmentation de l'expression génique de CYP11A1 dans les surrénales, qu'ils ont considérée comme une réponse secondaire à l'élimination du cholestérol déposé puisque CYP11A1 est une enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol qui convertit le cholestérol en prégnénolone.

Enfin, ils ont observé une diminution de l'expression génique de CYP11B1, qu'ils ont considéré comme n'ayant pas de signification toxicologique puisqu'il n'y a pas eu de modification des concentrations plasmatiques en hormone adrénocorticotrope (ACTH) et corticostérone pour aucun des deux sexes. Les auteurs concluent que l'axe hypophyse-surrénal ne serait pas altéré mais aucune information n'est disponible, ni dans le rapport d'études ni dans le volume 3B6, sur le protocole et les méthodes d'évaluation des taux circulants en ces hormones qu'on sait soumises à des variations circadiennes. Par ailleurs, ces observations ne sont pas chiffrées dans le rapport.

La LHS est une enzyme majeure impliquée dans le métabolisme du cholestérol car elle régule l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre précurseur de la stéroïdogénèse. Ainsi, l'inhibition de la LHS entraîne une diminution de synthèse de corticostérone sur des cellules surrénales primaires de souris (Kraemer et al. 2004). En revanche, Osuga et al. (Osuga et al. 2000) n'observent pas de modification des concentrations circulantes en testostérone, FSH (hormone de stimulation folliculaire), LH (hormone lutéinisante) et corticostérone chez la souris mâle LHS-KO. Ceci suggère qu'il pourrait exister des mécanismes de compensation in vivo, notamment pour la testostérone qui est produite par les testicules.

Compte tenu des résultats obtenus dans l'étude transgénérationnelle chez le rat, on peut se questionner sur l'impact du cyflumetofen sur les hormones sexuelles, la maturation sexuelle et la reproduction. Cette étude montre que le cyflumetofen induit un retard de maturation sexuelle dans les deux sexes de la génération F1 ainsi qu'une diminution des concentrations circulantes en FSH, progestérone et 17beta-estradiol associée à un allongement du cycle œstral chez les femelles F1. Par ailleurs, Osuga et al. (2000) montre que même si les profils hormonaux circulants ne sont pas altérés chez les souris mâle LHS-KO, le KO LHS induit une infertilité (Osuga et al. 2000). Enfin, il faut noter que l'inhibition de la LHS dans des cellules de

Leydig MA-10 (Zhou et al. 2020) ou lutéales bovines sensibles à la LH diminue la production de progestérone (Plewes et al. 2020).

Les observations réalisées sur des modèles *in vitro* renforcent les préoccupations quant aux effets perturbateurs endocriniens du cyflumetofen. Ces données montrent que le cyflumetofen n'a pas d'activité mimant l'action des oestrogènes. Par ailleurs, les données complémentaires présentées la proposition de classification suggèrent que le cyflumetofen n'a pas non plus d'activité mimant l'action des androgènes. Cependant, le cyflumetofen a une influence sur la voie de la stéroïdogénèse dans les surrénales, agissant comme un inhibiteur de la production de testostérone. Nous regrettons que l'étude ne fournisse pas de données sur les précurseurs prégnénolone et DHEA (déhydroépiandrostérone). Le cyflumetofen induit aussi la production d'oestradiol *in vitro* (sur cellules H295R de carcinome adrénocortical humain). Cependant, l'extrapolation de ces données à un contexte *in vivo* peut être questionné puisque l'estradiol est principalement synthétisé dans les gonades et le placenta, et non dans les surrénales, à partir de la testostérone qui subit une aromatisation par la CYP19. Il a été montré *in vitro* que le cyflumetofen n'est pas un inhibiteur de l'aromatase CYP19. Ainsi, le cyflumetofen aurait un effet sur la stéroïdogénèse au niveau des glandes corticosurrénales, ce qui entraînerait une inhibition de la production de testostérone. Ceci relève d'une perturbation endocrinienne.

Sur le long terme, la perturbation de la synthèse des hormones sexuelles, principalement chez les femelles, peut avoir des répercussions chez l'animal âgé et augmenter le risque de développer certains cancers dans les organes sexuels comme synthétisé dans la revue de (Kim et al. 2013) pour les hormones femelles et de (Soronen et al. 2004) pour les hormones mâles.

Nous constatons que de nombreuses études réglementaires et de la littérature montrent que le cyflumetofen altère l'équilibre des hormones sexuelles, la maturation sexuelle et la capacité de reproduction par des mécanismes possiblement communs aux surrénales, aux ovaires et aux testicules. Ceci a été identifié sur 4 espèces animales et *in vitro* sur des tests OCDE. Nous recommandons que l'effet PE du cyflumetofen soit revu de façon prioritaire en lien avec les critères PE issus du document guide réglementaire.

Bibliographie

- Galac S, Korpershoek E. 2017. Pheochromocytomas and paragangliomas in humans and dogs. *Vet Comp Oncol* 15:1158–1170; doi:10.1111/vco.12291.
- Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. 2013. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 34:130–162; doi:10.1210/er.2012-1043.
- Kraemer FB, Shen W-J, Harada K, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, et al. 2004. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol Baltim Md* 18:549–557; doi:10.1210/me.2003-0179.
- Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L, Prejbisz A, Robledo M, Taieb D, et al. 2020. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 38:1443–1456; doi:10.1097/HJH.0000000000002438.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, et al. 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:787–792; doi:10.1073/pnas.97.2.787.
- Plewes MR, Krause C, Talbott HA, Przygodzka E, Wood JR, Cupp AS, et al. 2020. Trafficking of cholesterol from lipid droplets to mitochondria in bovine luteal cells: Acute control of progesterone synthesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 34:10731–10750; doi:10.1096/fj.202000671R.

Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, et al. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92:281–286; doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.004.

Zhou C, Cheng J, Beadle R, Earley FG, Li Z, Maienfisch P. 2020. Design, synthesis and acaricidal activities of Cyflumetofen analogues based on carbon-silicon isosteric replacement. *Bioorg Med Chem* 28; doi:10.1016/j.bmc.2020.115509.

Contribution personnelle : Physio-pathologie de la glande thyroïde : comparatif entre les rongeurs, les canins et les humains

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Bernard Salles

Co-signataire : Thomas Claudepierre

Objectif

Chez le rat l'exposition à une majorité de fongicides inhibiteurs de succinate déshydrogénase est inductrice d'une hypertrophie et/ou d'une hyperplasie voire d'un développement tumoral de la glande thyroïde. La perturbation de la régulation des hormones thyroïdienne repose sur de nombreuses cibles, mais dans le cas des SDHI, il est mis en avant la réaction de glucuronono-conjugaison de la thyroxine (T4) dont le produit est excrété par la bile. Ainsi, il est rapporté depuis de nombreuses années par les industriels que l'exposition de rats à des substances inductrices d'enzymes hépatiques de phase II, en particulier les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), avait pour conséquence une augmentation de l'excrétion biliaire de T4 objectivée par une diminution de sa concentration sérique. Pour maintenir le taux de T4, le contrôle physiologique en retour correspond à une augmentation de la TSH à l'origine de l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie thyroïdienne. Afin d'évaluer et de questionner cette absence de prédictivité du modèle rongeur pour qualifier une perturbation de la fonction thyroïdienne chez les humains les données de physiologie et de pathologie comparées entre trois espèces, rat/chien/homme sont présentées et discutées. L'intérêt de comparer les résultats des effets long terme chez le chien repose sur l'utilisation de cette espèce dans des expérimentations de toxicité chronique présentées dans les dossiers des industriels avec celles des rongeurs.

1- Physiologie de la thyroïde chez les trois espèces.

La glande thyroïde

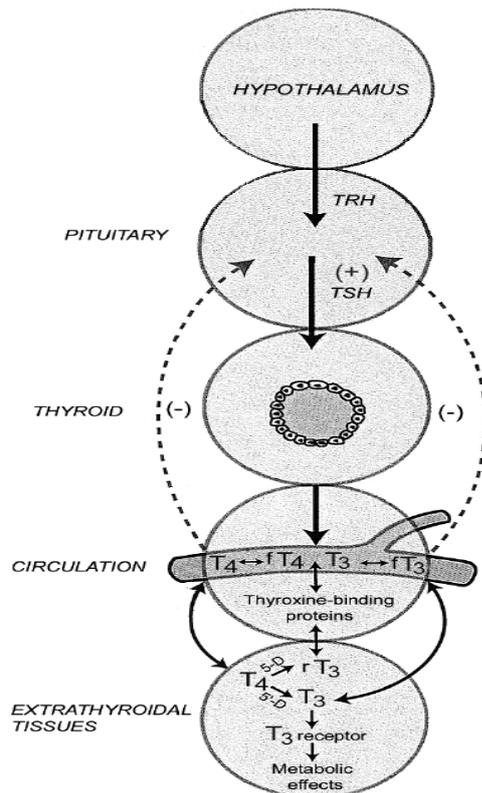
La glande thyroïde est structurellement conservée parmi les gnathostomes mais quelques différences histologiques sont observées entre les espèces.

Chez l'humain, la thyroïde est constituée de deux lobes reliés par un isthme, située à la base du cou, en avant de la trachée. Elle est organisée en follicules formés par une monocouche de cellules épithéliales, les thyrocytes, délimitant une cavité (l'espace folliculaire) contenant la substance colloïde dont la majeure partie est formée par la thyroglobuline. Les thyrocytes, responsables de la synthèse des hormones thyroïdiennes (HT), représentent plus de 99 % des cellules de la glande. Ces cellules bipolaires ont une fonction exocrine vers la cavité folliculaire, et endocrine vers la circulation sanguine. La thyroïde comporte par ailleurs des cellules dites parafolliculaires (cellules claires ou cellules C) responsables de la synthèse de la calcitonine, une hormone qui régule l'homéostasie calcique.

Chez le chien, la thyroïde est constituée de deux lobes comme décrit précédemment avec dans les espaces interfolliculaires un petit nombre de cellules C. Il est fréquent de trouver un tissu thyroïdien ectopique qui se présente sous la forme de nodules thyroïdiens répartis entre le larynx et le diaphragme. Environ 50%, variable selon les races, des chiens adultes

présentent des nodules au niveau du médiastin antérieur, près de la base du cœur. Ces nodules comportent exclusivement des thyrocytes et synthétisent les HT. Ils peuvent devenir néoplasiques chez le chien adulte et entrent dans le diagnostic différentiel des tumeurs de la base du cœur (Constantino-Casas *et al.*, 1996).

Chez le rat, la thyroïde est constituée de deux lobes comme décrit précédemment mais de chaque côté de la thyroïde se situent quatre glandes parathyroïdes qui participent au contrôle de la régulation phosphocalcique. Contrairement aux primates avec une thyroïde constituée de follicules uniformément large et abondant en colloïde, les rongeurs présentent une glande constituée de follicules de petite taille, avec un colloïde peu abondant, entourés d'un épithélium cuboïdal.



CG (*Chorionic Gonadotropin*) et d'une sous-unité β qui lui confère la spécificité d'interaction

Figure 1 : Représentation de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde.

T4 : thyroxine, fT4 thyroxine libre, T3 : triiodotyronine, fT3 : triiodotyronine libre, rT3 : reverse triiodotyronine, TSH thyrotropin, TRH : thyrotropin releasing hormone

Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (HT) régulent de nombreux processus physiologiques majeurs : le métabolisme cellulaire, l'énergie musculaire, la température corporelle, l'humeur, le rythme cardiaque, la motricité du tube digestif, l'utilisation et la transformation des glucides, des lipides et des protéines issues de l'alimentation ainsi que la croissance et le développement du fœtus et de l'enfant (Brent, 2012; Mariotti and Beck-Peccoz, 2000).

La thyrostimuline ou thyrotropine (*Thyroid-Stimulating Hormone* ; TSH), hormone d'origine hypophysaire, stimule la biosynthèse des HT dans la thyroïde. La TSH est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α commune à la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*), LH (*Luteinizing Hormone*), CG (*Chorionic Gonadotropin*) et d'une sous-unité β qui lui confère la spécificité d'interaction avec le récepteur (TSH-R) exprimé à la membrane basale des thyrocytes. La TSH permet la synthèse de la thyroglobuline (TG), précurseur de la tétra-iodothyronine ou thyroxine (T4) et de la tri-iodothyronine (T3).

Le colloïde joue un rôle important dans l'hormonogénèse en stockant la TG iodée à haute concentration. Une dose minimale d'iode est nécessaire pour un bon fonctionnement de la

thyroïde. Présent en très faible quantité dans le corps, il doit être fourni par l'alimentation quotidienne.

La TSH participe à la captation de l'iode de la circulation sanguine et sa fixation sur la TG, puis à terme à la libération des hormones T3, T4 dans la circulation sanguine. Dans la circulation sanguine T3 et T4 sont presque totalement liées à des protéines plasmatiques. Il est en

conséquence dosé la fraction totale des HT (TT4, TT3) ainsi qu'une fraction libre (FT4, FT3) (Figure 1).

La première étape du processus d'iodation concerne la capture d'ions iodures circulants via un symport Na^+/I^- membranaire, le *Sodium Iodide Symporter* (NIS) (Darrouzet *et al.*, 2014). L'activité et l'expression de ce transporteur sont stimulées par la TSH. L'iode est oxydé en présence d' H_2O_2 par la thyroperoxydase (TPO) localisée sur la membrane en contact avec le colloïde et peut ainsi se lier aux résidus tyrosine de la TG. L'activité de la TPO est stimulée par la TSH. Cette réaction aboutit à la formation du mono-iodotyrosine (MIT) puis avec la fixation d'un second atome d'iode, au di-iodotyrosine (DIT). Les molécules de TG iodées sont substrats d'une réaction de couplage des résidus iodotyrosines catalysée par la TPO produisant la T3 (MIT + DIT) et la T4 (DIT + DIT). Cette dernière est une hormone de réserve, produite en plus grande quantité que la T3 et qui peut être modifiée en la forme active T3 par déiodation. La MIT et la DIT sont métabolisées, dans la thyroïde, en iode et en tyrosine par une iodotyrosine déhalogénase (Dehal1). L'iode ainsi libéré peut alors être réintroduit dans le processus d'organification.

Chez l'humain, la quantité d'iode recyclé est 3 à 5 fois plus important que celle provenant de l'alimentation au niveau de l'iode utilisé dans la synthèse des HT (Hichri, 2018). Le stock de Tg iodée est important chez l'humain adulte, et correspond à trois mois de synthèse de T3 et T4, tandis qu'il est faible chez le nourrisson.

Pour un chien de type Beagle (15-20kg), la quantité quotidienne d'iode ingérée devra être au minimum de 140 μg (Feldman and Nelson, 2004), alors qu'elle est de 200 μg pour un homme de 70kg. On considère que les 2/3 de l'iode apporté au chien sont excrétés dans les féces et les urines et son recyclage est plus faible que chez l'homme. Ainsi le besoin en iode est donc plus important chez le chien que chez l'homme.

Chez le rat, même adulte, la réserve assure seulement quelques jours de synthèse sans apport d'iode, contrairement à l'homme (OECD, 2006).

Régulation de la production des hormones thyroïdiennes

L'hypothalamus maintient l'homéostasie des hormones thyroïdiennes. La régulation de la synthèse hormonale repose sur la sécrétion et action de l'hormone thyrotrope (*Thyrotropin-Releasing Hormone* ; TRH) produite par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et dont la sécrétion est contrôlée par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (*Thyroid Hormone Receptors* ; TR, rétrocontrôle négatif en cas d'excès) et une voie nerveuse (conditionnée par la disponibilité en nourriture, la température corporelle, le fonctionnement cardiovasculaire...) (Bianco *et al.*, 2019; Zoeller *et al.*, 2007).

La TRH stimule la synthèse de la TSH par l'antéhypophyse dont la sécrétion est aussi contrôlée par les TR (Szkudlinski *et al.*, 2002). La TSH se lie au récepteur de l'hormone stimulant la thyroïde (TSHR) exprimé au niveau de la membrane basolatérale des cellules folliculaires de la thyroïde. Ce récepteur couplé à la protéine G provoque une augmentation de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) entraînant une production accrue d'HT dans les cellules folliculaires. Seules les concentrations circulantes libres (FT4 et FT3) participent au rétrocontrôle négatif sur la TSH hypophysaire et la TRH hypothalamique.

Les HT (fraction libre) traversent la membrane des capillaires sanguins puis passent la membrane cellulaire via des transporteurs appartenant à différentes familles telles que les *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP), *Multidrug Resistance-Associated Protein*, *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide* et *Monocarboxylate Transporter* (MCT). Ces

transporteurs tissu-spécifiques participent à la régulation et effets des HT en fonction du tissu cible (Visser *et al.*, 2008).

Chez l'homme, la fraction majoritaire de T3 (80 %) est produite par déiodination de T4 *via* un processus enzymatique catalysé par les désiodases intracellulaires, D1 et D2 (Figure 2). T4, une pré-hormone qui n'a pas d'action sur les TR, peut aussi avec T3 être déiodinée en métabolites inactifs ou quasi-inactifs T3 *reverse* (rT3), T2 et T1. L'expression des 5'-désiodases D1, D2 et D3 est variable dans le temps et selon les organes, ce qui constitue un mécanisme important de modulation de la signalisation des HT.

Alors que les désiodases D1 et D2 sont métaboliquement actives dans la glande thyroïde des humains, seule D1 est exprimée dans la thyroïde des rats adultes. T3 peut être convertie par déiodation de T4 dans la thyroïde ou dans les tissus périphériques, soit produite par la thyroglobuline et sécrétée par la glande thyroïde.

Chez le rat environ 55% de la concentration de T3 circulante est produite par la glande thyroïde, la conversion dans les tissus extra-thyroïdiens étant peu efficace en raison d'une faible concentration de FT4 en regard de l'affinité de la désiodase D1 pour T4 (Chanoine *et al.*, 1993).

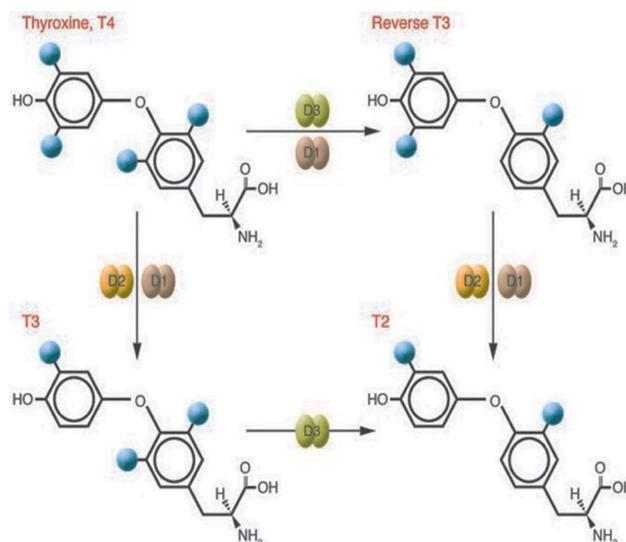


Figure 2 : Régulation de l'activité des HT par déiodation

Liaison des hormones thyroïdiennes à des transporteurs plasmatiques

Les hormones T3 et T4 sont liées de façon réversible à plus de 99 % aux protéines plasmatiques de transport : *Thyroxine-Binding Globulin* (TBG), transthyréline (TTR) ou albumine (Janssen and Janssen, 2017). La forme libre est biologiquement active car capable d'un transport intracellulaire alors que la forme liée non covalente et réversible est majoritaire (99.6-99.9%) et contribue ainsi aux temps longs de demi-vies plasmatiques bien que différentes selon les espèces (Oppenheimer, 1968).

Chez l'Homme, les HT circulantes sont à 75 % liée à la TBG synthétisée dans le foie, à 15 % à la TTR et à 10 % à l'albumine. La TBG présente une affinité plus forte pour T4 que pour T3. La TTR est le second transporteur sérique de T4 mais son transporteur majeur dans le liquide céphalo-rachidien (White and Kelly, 2001). Les concentrations sanguines de TBG, TTR et albumine sont respectivement aux environs de 0.27 μ M, 4.6 μ M ET 640 μ M. La demi-vie de

ces complexes est d'une journée pour T3 et environ 7 jours pour T4 (Lang, 2010). Lorsque la synthèse des HT est inhibée, le taux de T3 diminue d'environ 40% et celui de T4 d'environ 10% en 24h (Patrick, 2009).

La fraction libre des HT représente moins de 0,5 % de la concentration sérique totale (Refetoff, 2015). Chez l'homme, 80 % de la T3 circulante est produite dans les tissus périphériques, par déiodation en 5' de T4, majoritairement dans le foie par la désiodase D1. La concentration de T3 est indépendante des variations physiologiques ou pathologiques des protéines porteuses à l'inverse de T4. En effet, une augmentation de T4 peut résulter d'une élévation de TBG ou un déplacement de sa liaison aux protéines des transports qui représentent un réservoir d'HT circulantes avec une concentration très faible d'hormones libres.

Chez le chien l'affinité de T4 pour les protéines plasmatiques est forte avec une légère différence en répartition de la liaison par rapport aux humains soit 60%, 17% et 12% respectivement pour TBG, TTR et albumine (Larsson *et al.*, 1985). Pour les chiens la liaison des HT aux protéines sériques est plus faible que chez l'homme avec pour conséquence une plus faible concentration de TT3 et TT4, une plus forte concentration de FT3 et FT4 et une clairance des HT plus élevée (Dickson, 1993). La concentration de T4 libre est de 0.1% du pool de T4 chez le chien en comparaison de la valeur de 0.03% chez l'homme (Larsson *et al.*, 1985; Kaptein *et al.*, 1994). Cette observation explique pour partie pourquoi la posologie des thérapies de remplacement de T4 est supérieure chez les chiens par comparaison aux humains. La demi-vie plasmatique de T4 est de 10-16h, plus faible que chez l'homme. Comme chez l'homme la T3 présente une plus faible affinité pour ces protéines de transport ainsi qu'une demi-vie plus courte (5-6 h) comparé à celle observée pour T4 (Panciera, 1998).

Chez le rat le gène de la TBG n'est exprimé qu'en période post-natale, jusqu'à l'âge de 8 semaines, puis en période de sénescence (à partir de 7 mois) (Savu *et al.*, 1991). Le pool d'HT est lié à la TTR et à l'albumine. La liaison de T3 et T4 à la TTR est plus forte chez les souris par comparaison avec les rats (Capen, 1997). Durant la période pendant laquelle le rat ne synthétise pas la TBG, le temps de demi-vie de la thyroxine est d'environ 12 heures, alors qu'elle est de 5-7 jours chez l'homme (McClain, 1995). La demi-vie de T3 est plus courte soit d'environ 6h. Les niveaux d'hormones thyroïdiennes varient selon la souche de rat, le sexe et l'âge, les rythmes circadiens, la température ambiante, les techniques de prélèvement sanguin associées au stress ou la manipulation des animaux, et l'activité relative de l'animal et, chez les femelles, le cycle œstral.

En rapport avec les valeurs de la demi-vie de T4 et de T3 chez l'homme et le rat, la production de T4 et de TSH est plus élevée chez le rat que chez l'homme. Puisque T3 est lié avec une plus faible affinité que T4 aux protéines de transport, il est observé un renouvellement plus rapide et une demi-vie plasmatique plus courte pour la plupart des espèces.

Le pourcentage de FT4 active est plus faible chez les espèces avec des niveaux élevés de TBG que chez les animaux chez lesquels la liaison de T4 est limitée à l'albumine et à la préalbumine. Ainsi, pour un rat sans thyroïde fonctionnelle la posologie journalière de substitution de T4 est d'environ 10 fois supérieure (20 µg/kg/p.c) à celle pour un adulte humain (2,2 µg/kg/p.c) (Capen, 1997).

Seule la fraction libre de T3, hormone active, pénètre dans les tissus à l'exception du cerveau car la barrière hémato-méningée est relativement imperméable cette hormone. En revanche, T4 franchit la barrière et est transportée dans le liquide céphalo-rachidien, via les plexus choroïdes (Janssen and Janssen, 2017; Thompson and Potter, 2000). La désiodase D1 n'étant pas exprimée dans le cerveau T4 est convertie en T3 par la D2 exprimée seulement dans le système nerveux, l'hypophyse, le tissu adipeux brun et le placenta. Dans tous les

tissus, T4 et T3 sont dégradées en dérivés diiodés ou monoiodés inactifs notamment par la désiodase D3.

Taux sériques des hormones thyroïdiennes

Le diagnostic d'une pathologie de la thyroïde (hypo ou hyper) repose pour partie sur le dosage des HT dont les valeurs normales rapportées dans le Tableau 1.

Les valeurs normales du taux sanguin de TSH varient selon la technique utilisée et sont affectées par de nombreux facteurs dont l'heure de prélèvement, l'âge, le genre et la génétique. Chez l'homme le taux 30 min après la naissance est élevé (80 µU/ml) puis redescend dans les 5 premiers jours de la vie. Le taux de TSH est élevé au cours des premiers mois de grossesse mais il doit être compris entre 0.4 et 2.5 µU/ml au premier trimestre de la grossesse. Chez les personnes âgées la TSH tend à augmenter et plus particulièrement chez les femmes. De nombreux médicaments interfèrent avec les résultats du dosage (corticoïdes, dopaminergiques, opiacés, somatostatine, métochloramide...). La TSH est sécrétée selon un rythme circadien avec un pic nocturne (vers 2h) et un pic dans l'après-midi. La sécrétion correspond à 12 pulses de 0.5 mU/l d'amplitude moyenne sur 24 h pour un sujet sain. Ces différents facteurs influent sur le résultat du dosage et ces variations sont aussi retrouvées pour les chiens et les rats (Döhler *et al.*, 1979).

Tableau 1 : Concentrations sériques des HT

Hormone	Homme	Chien	Rat
TSH	0.2-4.7 µU/ml	3.5 ± 1.7 µU/ml	140 ± 12 µU/ml
TT4	50-160 nmole/l	15-45 nmole/l	27-70 nmole/l
FT4	9-25 pmole/l	10-39 pmole/l	12-25 pmole/l
TT3	1-2.8 nmole/l	0.4-1.4 nmole/l	0.9-1.2 nmole/l
FT3	3-9 pmole/l		2.3-3.1 pmole/l

Références - Homme : <https://globalrph.com/labs/t>, Haute Autorité de Santé (HAS 2000), (Bregengård *et al.*, 1987) ; Chien : (Anyogu *et al.*, 2017; Daminet *et al.*, 1999; Hoh and Oh, 2006; Gieger *et al.*, 2000; Larsson, 1981; Paradis *et al.*, 1996) ; Rat : (Beekhuijzen *et al.*, 2019; Capen, 1997; Liu *et al.*, 1995; Roques *et al.*, 2013; Christian and Trenton, 2003)

Les valeurs normales du taux sanguin de TSH varient selon la technique utilisée et sont affectées par de nombreux facteurs dont l'heure de prélèvement, l'âge, le genre et la génétique. Chez l'homme le taux 30 min après la naissance est élevé (80 µU/ml) puis redescend dans les 5 premiers jours de la vie. Le taux de TSH est élevé au cours des premiers mois de grossesse mais il doit être compris entre 0.4 et 2.5 µU/ml au premier trimestre de la grossesse. Chez les personnes âgées la TSH tend à augmenter et plus particulièrement chez les femmes. De nombreux médicaments interfèrent avec les résultats du dosage (corticoïdes, dopaminergiques, opiacés, somatostatine, métochloramide...). La TSH est sécrétée selon un rythme circadien avec un pic nocturne (vers 2h) et un pic dans l'après-midi. La sécrétion

correspond à 12 pulses de 0.5 mU/l d'amplitude moyenne sur 24 h pour un sujet sain. Ces différents facteurs influent sur le résultat du dosage et ces variations sont aussi retrouvées pour les chiens et les rats (Döhler *et al.*, 1979).

La concentration de TSH sérique est 25-100 fois plus élevée chez le rat que chez l'homme ou le chien (Tableau 1). Par ailleurs un effet du genre est observé avec par exemple une concentration plasmatique de TSH chez les rats femelles correspondant à environ deux fois celle observée chez les rats mâles (Christian and Trenton, 2003).

Concernant T3 et T4, on observe une concentration plasmatique similaire pour les 3 espèces. Le taux de T4 est plus important chez le nouveau-né (120-210 nmole/L chez l'homme) puis baisse ensuite pour se stabiliser. L'impact d'une diminution de T4 dans le sérum maternel sur le neuro-développement des mammifères a été établi sur la base d'AOP (Noyes *et al.*, 2019; Sachana *et al.*, 2021).

Le taux d'HT libres est environ 1000 fois inférieur à celui de l'HT totale pour les trois espèces. Des variations de la concentration de T4 sont observées selon l'heure du prélèvement. Par exemple chez le chien la concentration de T4 concentration est de 1.75 ± 0.75 µg/dl à 8 h, 3.28 ± 0.86 µg/dl à 11 h, 3.54 ± 1.15 µg/dl à 14 h, 2.90 ± 1.03 µg/dl à 17 h, 2.7 ± 0.90 µg/dl à 20 h des valeurs significativement différentes par exemple entre 8 h et 11 ou 14 h. ($p < 0.001$) ou entre 8 h et 17 ou 20 h ($p < 0.05$) (Hoh and Oh, 2006).

T3 peut être soit convertie par déiodation de T4 dans la thyroïde ou dans les tissus périphériques, soit produite par la thyroglobuline et sécrétée par la glande thyroïde. Chez l'homme, comme indiqué précédemment, 80% de T3 est produite par déiodation de T4 dans les tissus périphériques. En revanche, chez le rat environ 55% de la concentration de T3 circulante est produite par la glande thyroïde, la conversion dans les tissus extra-thyroïdiens étant peu efficace en raison d'une faible concentration de FT4 en rapport avec l'affinité de la désiodase D1 pour T4 (Chanoine *et al.*, 1993).

Chez le chien, la production est similaire à celle trouvée chez l'homme avec une synthèse par la glande de T4 et de 20% de la T3. Chez le chien le dosage de T3 est rarement utilisé pour une recherche diagnostique d'hypothyroïdie. Il est préféré le dosage du triptyque T4-TSH-cholestérol avec une valeur normale pour le cholestérol < 2 g/l.

Classiquement, les biomarqueurs utilisés pour caractériser la perturbation de l'axe HPT sont les concentrations sanguines de T4 (TT4 et FT4) et de TSH. Cependant chez le rat, il est rarement produit dans les dossiers réglementaires des résultats de dosage de TSH et T4 et presque jamais de FT4.

Métabolisme, transport et excrétion des hormones thyroïdiennes

Le foie représente un site majeur de métabolisation de T4 qui traverse la membrane plasmique grâce à des transporteurs tels que OATP1C1, MCT8 et MCT10, OAT. Le métabolisme est le suivant : (i) une réaction de conjugaison qui implique la sulfatation par les sulfotransférases (SULT) et la glucuronylation par les uridine diphosphate glucuronyltransférases (UGT); (ii) une réaction de désiodation qui implique des désiodinases (D1, D2, D3) (Figure 2) (Darras and Van Herck, 2012); (iii) une réaction de dégradation par clivage et modifications de la chaîne latérale comme indiqué dans la Figure 3, conduisant à des métabolites inactifs sur les récepteurs des HT.

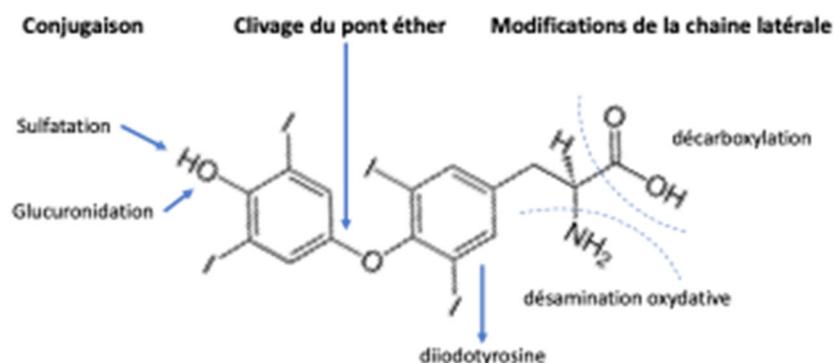


Figure 3 : Métabolisme de la thyroxine.

La réaction métabolique majeure est la conjugaison de T4 au niveau hépatique avec une élimination de la circulation sanguine par voie biliaire en utilisant les transporteurs d'efflux MRP2, MDR3 ou MDR1. Il est à noter que ces transporteurs sont classiquement présentés comme des enzymes du métabolisme de phase III et en conséquence sous le contrôle transcriptionnel de nombreux agents chimiques inducteurs ou inhibiteurs des enzymes du métabolisme (phase I : oxydation-réduction, phase II : conjugaison), principalement hépatiques.

L'hormone T4 est conjuguée dans le foie avec une réaction amplifiée suite à l'exposition à des inducteurs des enzymes du métabolisme. La T4 glucurono-conjuguée (T4-G) est sécrétée dans la bile et en réponse à une augmentation de l'excrétion, la diminution de T4 plasmatique stimule la production de TSH. La glucuro-conjugaison de T3 est moins importante quantitativement que celle de T4 chez le rat et peu active chez l'homme. Cependant la voie de glucuronoconjugaison est responsable de l'élimination d'environ 25% de FT4P en 24h et de FT3 en 6h (Curran and DeGroot, 1991). L'activité des UGT est supérieure pour la conjugaison de T4 chez la souris par comparaison au rat (Tong *et al.*, 2007). Par ailleurs T4G peut être déconjuguée dans l'intestin ou d'autres organes via une β -glucuronidase. Ainsi l'intestin peut être utilisé comme réservoir en cas d'augmentation importante de la voie d'excrétion (Wu *et al.*, 2005).

Les isoenzymes qui catalysent la réaction sont UGT 1A1 et 1A3 chez l'homme (Kato *et al.*, 2008) et UGT 1A1, 1A6 et 2B1 chez le rat (Bock, 2011). Chez le rat T4 est substrat des isoformes de la famille UGT1A (principalement UGT1A1 et 1A6) alors que T3 est substrat des isoformes de la famille UGT2 (UGT2B6) (Visser, 1996; Vansell and Klaassen, 2002). Il est possible de tester l'induction de ces différentes isoformes d'UGT entre l'homme et le rat en exposant des cultures d'hépatocytes cryopréservés à des agents chimiques comme les SDHI ou d'autres agents inducteurs d'enzymes du métabolisme.

Les réactions de sulfo-conjugaison reposent sur au moins sept isoformes de la sulfotransférase (SULTx) (Gamage *et al.*, 2006). L'expression des isoenzymes est variable selon les tissus avec une réaction de conjugaison des HT majoritairement réalisée dans les hépatocytes. La sulfatation des HT chez l'homme est médiée par les isoformes SULT2A et SULT1A1 (Runge-Morris and Kocarek, 2005). Cette réaction facilite la déiodation rapide de T4 sulfo-conjugué (T4-S) en métabolite inactif rT3-S dépendant de la désiodinase D1 alors que la conversion en T3-S est complètement bloquée. La sulfatation de T3 est dépendante de SULT1B (Runge-Morris and Kocarek, 2009).

Seules de faibles quantités de T3-S ou T4-S sont présentes dans la bile, le sérum ou les urines (Visser *et al.*, 1998). Au contraire de la glucuro-cojugaison dont l'activité est plus élevée chez le rat, la réaction de sulfatation est sensiblement similaire chez l'homme et le rat (Richardson *et al.*, 2014). Le rôle de la sulfatation dans le métabolisme des HT est secondaire par rapport à la réaction de glucurono-conjugaison chez le rat, alors que c'est la réciproque chez l'homme.

Le transport des HT est essentiel pour le développement normal des tissus du fœtus et en particulier le système nerveux central. Les HT sont prises en charge par des transporteurs pour passer les membranes plasmiques tels que OATP1C1, MCT8 et MCT10. Des mutations du transporteur MCT8 exprimé dans le tissu nerveux sont associées à un niveau élevé de T3 et un retard psychomoteur sévère (Visser *et al.*, 2008).

Les HT conjuguées peuvent également être prises en charges par de transporteurs, par exemple le OATP1B1 pour les sulfoconjugués. L'importance de l'action des HT dans le développement du cerveau est illustrée par exemple par un déficit en T3 provoquant une diminution des performances neuromotrices et cognitives du nouveau-né (Bernal, 2017; Valcárcel-Hernández *et al.*, 2022; Williams, 2008; Zoeller and Rovet, 2004). L'apport maternel des HT représente la source unique pour le fœtus (premier trimestre de la grossesse chez la femme) jusqu'à ce que la glande thyroïde fœtale soit fonctionnelle (Korevaar *et al.*, 2016, 2018). Ce résultat illustre l'intérêt de mener en cas de suspicion de perturbations de l'axe HPT, des expérimentations de reproduction chez le rat avec le suivi sur 2 générations associé aux dosages TSH, T4, FT4.

Liaison des hormones thyroïdiennes aux récepteurs

Deux isoformes de récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) sont codées par les gènes *THRA* et *THRB*, chacune donnant lieu à quatre variantes : TR α 1, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 et TR β 1, TR β 2, TR β 3, TR $\Delta\beta$ 3 (Sirakov and Plateroti, 2011). Chez les vertébrés, T3 est le ligand majoritaire de TR α 1 (Taylor and Heyland, 2017; Vella and Hollenberg, 2017; Taylor and Heyland, 2017).

Outre les récepteurs nucléaires, l'intégrine $\alpha\beta$ 3, un récepteur et molécule d'adhésion transmembranaire liant la vitronectine (une glycoprotéine sérique), a été identifiée comme récepteur de nombreux ligands incluant les HT (Bergh *et al.*, 2005).

Le modèle classique génomique de régulation repose sur l'entrée de T3 et T4 dans la cellule soit par diffusion passive soit via des transporteurs membranaires. T4 est déiodée et T3 pénètre dans le noyau et se fixe sur les TR ce qui active la transcription des gènes-cibles. Les TR sont liés à l'ADN au niveau d'éléments de réponse (*Thyroid-Response Elements ; TRE*) dans des promoteurs de gènes cibles. En formant des hétérodimères avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) ceux-ci échangent les corépresseurs liés aux TRs avec des coactivateurs, permettant l'activation transcriptionnelle des gènes cibles (Astapova and Hollenberg, 2013). Le récepteur TR β semble principalement impliqué dans le rétrocontrôle de la sécrétion hypophysaire de TSH et dans le développement de l'audition. En revanche, l'inactivation de TR α conduit à une atrophie thyroïdienne avec diminution des taux de TSH et des HT. Certains organes constituent des tissus cibles spécifiques d'un type de récepteur comme l'oreille interne, l'hypophyse, le cœur, le foie, l'os ou l'intestin grêle. Cependant, les TR α et TR β peuvent coopérer dans certains cas (Flamant *et al.*, 2007).

Le modèle non génomique repose sur la fixation de T4 et T3 à l'intégrine $\alpha\beta$ 3 ce qui active la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK). T4 est le ligand principal dans cette voie, alors que T3 a une action limitée (Taylor and Heyland, 2017; Davis *et al.*, 2016, 2021).

Les gènes régulés par la liaison des HT à l'intégrine $\alpha V\beta 3$ incluent ceux codant pour les récepteurs d'hormones non peptidique TR et ER α et d'autres codant pour des protéines qui contrôlent l'angiogenèse (Bergh *et al.*, 2005) et qui sont associés au développement tumoral (*FGF2*, *MMP2*, *HIF1A*, *COX2*) (Davis *et al.*, 2021).

La régulation non génomique fait aussi intervenir la mitochondrie avec T3 activateur de la transcription de gènes-cibles mitochondriaux. L'hormone T3 exerce un effet sur la respiration cellulaire via la liaison aux récepteurs mitochondriaux p43 et p28, avec pour conséquence une contribution à l'intolérance au glucose et à l'insulino-résistance (Casas *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2016). Enfin T2 participe aux régulations métaboliques via des interactions complexes avec la chaîne respiratoire mitochondriale (Davis *et al.*, 2016; Lanni *et al.*, 2005).

Physiologie comparative

Des différences de structure histologique de la glande thyroïde sont observées entre les trois espèces mais la régulation de l'axe HPT est similaire. Il est rapporté depuis une quarantaine d'années que le rat n'était pas un bon modèle pour l'exploration de perturbation de la thyroïde en rapport avec l'absence de production de TBG (Döhler *et al.*, 1979). D'autres différences disqualifient le modèle rongeur pour une extrapolation à l'homme au regard des perturbations de la régulation thyroïdienne.

A l'exception de la concentration de TSH plus élevée chez le rat en comparaison de l'homme et du chien, les valeurs des concentrations des HT sont sensiblement équivalentes pour les trois espèces. Si l'hormone active T3 est très majoritairement produite par déiodation de T4 dans les tissus périphériques, principalement le foie, pour l'homme et le chien (80% de la production), elle est formée à 55% dans la glande thyroïde chez le rat. Les taux des HT sont plus stables chez l'homme et le chien en comparaison du rat principalement dû à l'absence de synthèse de TBG qui fixe avec une forte affinité les HT.

Une faible activité de conjugaison de T3 est retrouvée chez les humains en comparaison des rongeurs (Findlay *et al.*, 2000). Au contraire des humains la réaction de glucuronidation des HT est prédominante chez le rat espèce pour laquelle les perturbations dans l'homéostasie des HT induisent une régulation positive des différents paramètres de contrôle qui expliquent sa plus grande sensibilité aux perturbateurs thyroïdiens.

2- Mécanismes d'action des agents perturbateurs thyroïdiens (THDC, *Thyroid Hormone Disrupting Compounds*)

Rappel des cibles

Pour expliquer une augmentation de fréquence des adénomes et/ou adénosarcomes de la glande thyroïde, il est souvent proposé dans les rapports des industriels un effet spécifique aux rongeurs impliquant une augmentation de la clairance biliaire de T4-G en rapport avec l'hépatomégalie (et l'induction enzymatique ?), induisant une augmentation de concentration de TSH en rétro-contrôle de la régulation de l'axe HPT avec un effet de la TSH conduisant à une hyperplasie de la thyroïde (McClain, 1989, 1995). Ce mécanisme peut être élargi à d'autres cibles que la seule augmentation de clairance biliaire comme illustré dans la figure 4.

Cependant avant d'examiner les événements clés de ce processus de tumorigenèse, il est utile de rappeler les différentes cibles qui sont susceptibles d'expliquer un dysfonctionnement de la régulation de la thyroïde.

Les perturbateurs thyroïdiens (THDC) exercent leur action sur une plusieurs des cibles indiquées dans la figure 5. De plus, des régulations croisées entre les axes hypothalamo-hypophysio-gonadique (*Hypothalamic-Pituitary-Gonad* ; HPG) et hypothalamo-hypophysio-thyroïdien (*Hypothalamic-Pituitary-Thyroid* ; HPT) compliquent l'analyse des effets de THDC.

L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) a publié en 2014 (révision en 2018), un document guide pour identifier les principes actifs phytopharmaceutiques et biocides présentant une activité de perturbateur endocrinien (régulations EU #528/2012 et EC #1107/2009) (OECD, 2018, 2014).

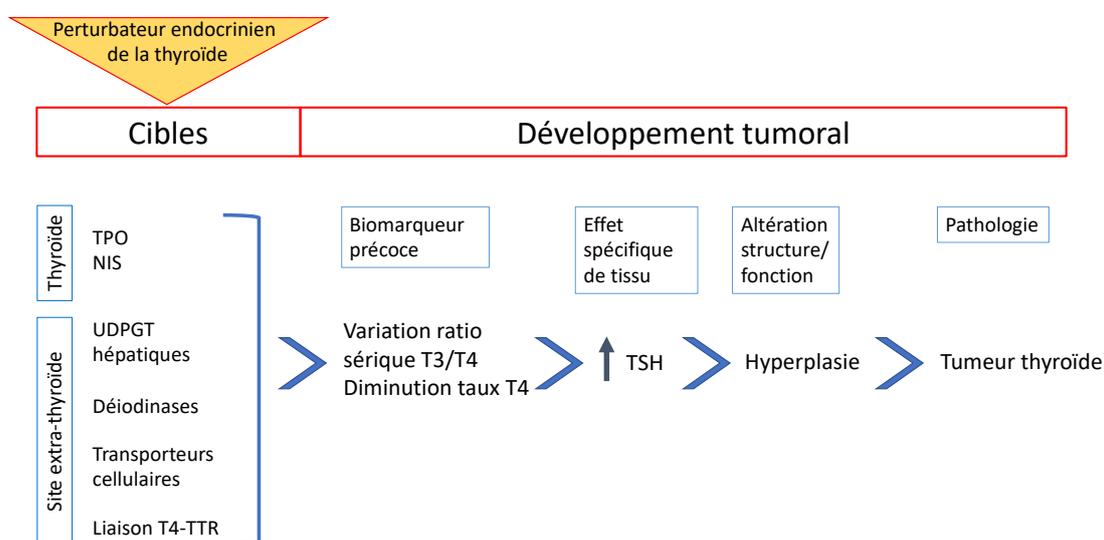


Figure 4 : Développement de tumeurs de la thyroïde chez les rongeurs

Les tests ciblent les régulations des voies EATS (Estrogenic, Androgenic, Thyroidal, Steroidogenic) et sont organisés en 5 niveaux décrits ci-dessous (les essais réglementaires européens correspondants sont rapportés) :

- Niveau 1 : recueil de données pour trier et prioriser (inclus également (Q)SAR)
- Niveau 2 : tests in vitro sur cellules, à visée mécanistique (criblage)
- Niveau 3 : tests sur organismes entiers avec un seul agent, reproduisant les mécanismes spécifiques des critères de perturbation
- Niveau 4 : tests sur organismes entiers, reproduisant l'effet néfaste spécifique des critères de perturbation
- Niveau 5 : tests sur organismes entiers renseignant sur les effets perturbateurs endocriniens et autres mécanismes, sur tout le cycle de vie
-

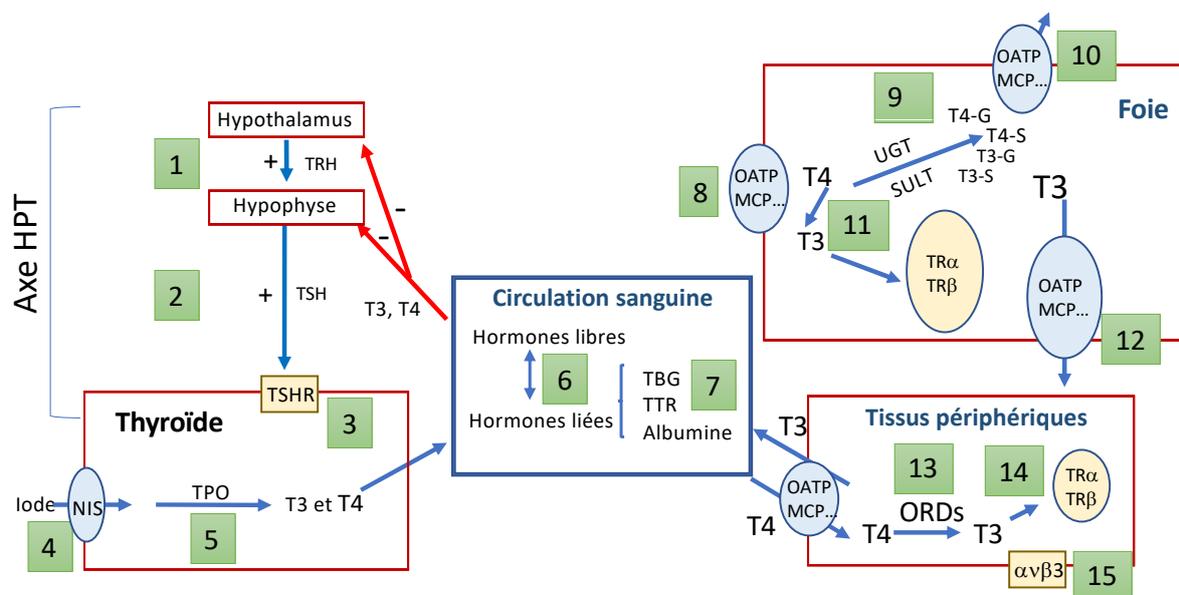


Figure 5 : Régulation thyroïdienne et sites de perturbation.

Puisqu'une diminution de la concentration de T4 est mise en avant pour expliquer un effet hyperplasique de la thyroïde sous l'action de la TSH, il est utile de rappeler les mécanismes majeurs (Figure 5) à l'origine d'une baisse du taux de T4 qui correspondent à :

- Un déficit de production de TSH (#1, 2)
- Une diminution d'apport d'iode (#4)
- Une inhibition de l'activité du symport NIS (#4)
- Une inhibition de l'activité de la TPO (#5)
- Un déplacement de la fixation sur les protéines de transport (#6)
- Une augmentation de capture par les hépatocytes (#8)
- Une augmentation de la clairance biliaire (#10)
- Une diminution de l'export (#12)

De nombreux agents chimiques sont susceptibles d'interférer avec la régulation des hormones thyroïdienne dont un bref aperçu est rapporté dans le tableau 2.

En rapport avec la question de l'absence de pertinence d'une induction de tumeurs de la thyroïde suite à l'exposition à des SDHI chez le rat dans le but d'extrapoler les résultats à l'homme, nous limiterons la discussion aux variations de la concentration de T4 associée ou non à une hépatomégalie.

Tableau 2 : Cibles de quelques agents perturbateurs de la fonction thyroïdienne

RÉACTIONS

Capture d'iode: natrium iodide symporter (NIS)

Oxydation iodures et incorporation dans Tg:
thyroperoxydase (TPO). Formation MIT, DIT, T3 et T4

Métabolisme MIT et DIT:
iodotyrosine déhalogénase (Dehal1)

Métabolisme T4 : désiodases T4 > T3 et rT3

Liaison HT protéines plasmatiques:
Thyroxine-Binding Globulin (TBG), Transthyrétine (TTR), Albumine

Transport HT intra-cellulaire: Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP) et Monocarboxylate Transporter (MCT).

Métabolisme : conjugaison UGT, ST et désiodases

Liaison aux récepteurs (RT)

RÉGULATEURS

TSH (+), Phtalates (+)
Perchlorate, thiocyanate, TCDD, PCB-126 (-)

TSH (+)
Propylthiouracil, methimazole, flavonoïdes (-)

TSH (+)
Propylthiouracil, methimazole (-)

HCB (+) cerveau fœtus et nouveau-né

PCB, phtalates, PCP : liaison TTR

Butylbenzylphtalate (-)

Nombreux xénobiotiques et stéroïdes (+ ou -)

PCB hydroxylés, BPA (-)

Induction des enzymes du métabolisme hépatique

Dans ce contexte d'induction des enzymes du métabolisme, il est en premier lieu discuté de l'effet du phénobarbital sur la régulation de la thyroïde puisqu'il est considéré comme spécifique du modèle rongeur non extrapolable aux humains et parfois utilisé en co-experimentation avec un fongicide SDHI

Le phénobarbital

Chez l'homme le phénobarbital (PB), un des traitements anti-épileptiques, a été donné par voie orale à des volontaires sains (100 mg/jour, 14 jours). Le traitement ne modifiait pas les concentrations sériques de T4, T3 et TSH (Ohnhaus and Studer, 1983). On notera cependant que la posologie chez l'homme, rapportée au poids corporel (environ 1.5 mg/kg/j) est 60 fois plus faible que celle utilisée chez le rat.

Le PB est inducteur prototype de la sous-famille CYP2B avec CYP2B6 mais aussi CYP3A4 ainsi que CYP2A3, CYP2C9 et CYP2C19 (Pelkonen *et al.*, 2008). Dans le traitement au long cours de l'épilepsie par le PB (e 2-3 mg/kg/jour) il n'est pas noté de modification du taux de TSH et T4. Cependant, ce traitement induit une augmentation des γ -glutamyltransférases, transaminases et/ou des phosphatases alcalines hépatiques (Charalambous *et al.*, 2016).

Le PB utilisé en traitement anti-épileptique de patients ne provoque pas d'augmentation de risque de développement de cancers (IARC, 2001). Chez les rongeurs le PB est connu comme un cancérigène non génotoxique avec l'induction d'hépatocarcinomes (Lee, 2000; Whysner *et al.*, 1996) alors qu'il n'induit pas de tumeur du foie et des voies biliaires chez l'homme (IARC, 2001). Néanmoins l'évaluation par l'IARC conclue au classement 2B avec comme indication de l'effet cancérigène du PB « inadequate evidence » pour l'homme et « sufficient evidence » pour les rongeurs (IARC, 2001).

Chez l'homme il est décrit une association avec une augmentation de risque modéré pour les cancers du poumon, des ovaires et de la vessie.

Chez le chien, comme chez l'homme l'exposition au PB (1.2 à 2 mg/kg/j) n'induit pas de modification du taux des HT suite à une exposition à 1.2 à 2 mg/kg/j pendant 1 semaine puis 2.6 à 4.5 mg/kg/j pendant 2 semaines (Daminet *et al.*, 1999). Un traitement avec le PB (4.4-6.6 mg/kg/j) pendant 27 semaines induit une augmentation significative de ALT, ALP, cholestérol, TSH et une diminution de FT4 et TT4 (Gieger *et al.*, 2000). Le retour aux valeurs normales est retrouvé entre 1 et 5 semaines après l'arrêt de l'exposition selon les indicateurs biochimiques.

Chez le rat l'exposition au phénobarbital (PB) (100 mg/kg/j) pendant 2 semaines provoque une augmentation de la taille du foie et de la thyroïde. Avec l'induction de l'activité UGT (190%), la concentration de de T4 et T3 conjugué (T4G, T3G) est augmentée et en rapport avec l'augmentation de la clairance biliaire on observe en retro-contrôle une augmentation du taux de TSH (McClain, 1989). Les rats sont exposés à une dose très élevée (100 mg/kg/j) dont la concentration sérique n'a pas été évaluée. Cependant, une bonne corrélation est observée entre l'activité UGT et la diminution de la concentration sérique de TT4 pour une exposition pendant 15 jours avec une échelle de doses de 46 à 179 mg/kg/j (Liu *et al.*, 1995).

L'exposition chronique au PB seul provoque une hépatomégalie corrélée à une multiplication des hépatocytes. Cette augmentation est réversible après arrêt du traitement.

Le phénobarbital seul en exposition chronique induit des adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez les souris (augmentation de l'incidence de 77%) et des adénomes hépatocellulaires dans une seule étude chez le rat parmi celles examinées par le CIRC. En revanche suite à un pré-traitement avec un inducteur le PB montre une action promotrice ou inhibitrice de tumeurs selon l'agent initiateur utilisé. Le PB est donc un promoteur de tumeurs folliculaires de la thyroïde chez le rat pré-traité avec le NBHPA (N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine) ou le NDEA (N-nitrosodiethylamine) (IARC, 2001).

En revanche après traitement par un inducteur, l'exposition au PB n'a pas d'effet promoteur tumoral hépatique chez le hamster (Tanaka *et al.*, 1987).

Chez le singe (*Erythrocebus patas*) après un traitement au NDEA puis exposition au PB il est observé un effet promoteur du développement d'hépatocarcinomes (Rice *et al.*, 1989). Le facteur d'induction des enzymes de phase 1 en particulier CYP2B1 et CYP2B2 est corrélé avec le degré de promotion tumoral. Il est intéressant de noter que le PB n'induit pas ces enzymes de phase 1 chez le hamster, un résultat à rapprocher de l'absence d'effet promoteur chez cette espèce (IARC, 2001).

L'induction de tumeurs hépatiques suite au traitement par le PB dépend du récepteur CAR dont l'activation est requise pour une réplication des hépatocytes, l'induction de CYP2B et le processus d'hépatomégalie. En revanche les hépatocytes humains sont réfractaires à l'effet mitogène du PB et d'autres activateurs de CAR (Lake, 2018). L'hépatomégalie et l'augmentation de synthèse d'ADN, deux réponses classiques aux composés de type phénobarbital, ne sont plus observées chez les animaux CAR^{-/-} (Haines *et al.*, 2018). Comme CAR et PXR forme un hétérodimère avec RXR, ils peuvent partiellement se substituer pour la liaison à l'ADN et pour la réponse au phénobarbital (Moore *et al.*, 2000; Sueyoshi *et al.*, 1999).

Le MoA proposé pour la formation de tumeurs hépatiques chez les rongeurs par le PB inclue l'activation de CAR, la prolifération des hépatocytes, l'inhibition de l'apoptose, l'hypertrophie hépatique et le développement de foyers d'hépatocytes altérés (nodules eosinophiles, basophiles) (Elcombe *et al.*, 2014).

L'étude de fonctions divergentes du PB sur les récepteurs CAR et PXR entre l'homme et le rat a été testé en construisant des souches de souris transgéniques pour l'expression des récepteurs humains (Braeuning *et al.*, 2014). Le NDEA a été utilisé comme agent initiateur suivi d'une exposition au PB pendant 10 mois. L'analyse des tumeurs hépatiques montre un effet promoteur du PB chez la souris WT alors que l'effet est beaucoup moins prononcé pour les souris humanisées.

En conclusion, l'évènement clé dans le mécanisme d'induction de tumeurs hépatiques par le PB repose sur l'activation de CAR suivi par l'expression de gènes sous le contrôle de ce récepteur avec pour effet une augmentation de prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose avec la formation de foyers hépatiques.

Si le processus d'hépatocarcinogenèse est documenté pour le PB comme promoteur tumoral, il n'est pas, en exposition unique, un inducteur de tumeurs de la thyroïde chez le rat contrairement à ce que certains rapports d'industriels avancent pour les SDHI.

Autres inducteurs

Afin d'analyser le mode d'action d'inducteurs d'enzymes hépatiques de phase 2 comme évènement clé responsable d'une diminution de T4 et augmentation de concentration de TSH responsable d'une hypertrophie/hyperplasie de la thyroïde, C.D. Klaassen et coll. ont testés plusieurs inducteurs d'UGT chez le rat (Barter and Klaassen, 1992). Le PB, le 3-methylcholanthrene (3MC), le pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) et le polychlorobiphenyl (PCB) provoquent une diminution du taux de T4 (Barter and Klaassen, 1994). Après 3 semaines d'exposition l'activité des UGT est augmentée de 190% pour le PB, 290% pour le 3MC, 260% pour le PCN et 550% pour le PCB (Barter and Klaassen, 1994). Le traitement avec le PB, 3MC et PCN réduit le taux de T4 de 30 à 40% alors que le PCB produit une diminution de 80%. La diminution de la concentration sérique de T4 est corrélée au facteur d'induction des UGT.

Il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'augmentation de T4-G, la diminution de T4 sérique et l'augmentation de TSH suite à un traitement par un des inducteurs 3-MC, PCB, PB, PCN chez le rat (Alan Hood and Klaassen, 2000). Il n'est pas observé d'augmentation de la glucuroconjugaison de T3 par le PB dont la concentration reste stable peut-être en rapport avec sa synthèse via la capture de l'iode dépendant du taux élevé de TSH (Richardson and Klaassen, 2010).

D'après des essais *in vitro* le taux de glucurono-conjugaison de T4 suite à un traitement par le 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) est supérieure dans les hépatocytes de rats par comparaison aux hépatocytes humains (Richardson *et al.*, 2014). Ce résultat suggère que la voie de métabolisation de T4 serait favorisée chez le rat comparée à l'homme.

Le PB et le PCN induisent les UGT, la concentration de TSH et la prolifération des thyrocytes (Hood *et al.*, 1999; A. Hood and Klaassen, 2000). Le 3MC et le PCB sont aussi des inducteurs d'UGT mais sont de faibles inducteurs du taux de TSH et du processus de prolifération des thyrocytes. Ces quatre inducteurs d'enzymes du métabolisme hépatique induisent une augmentation de T3G en rapport avec une augmentation du taux de TSH (Alan Hood and Klaassen, 2000; Vansell and Klaassen, 2002). Ce résultat indique que la réaction de glucuroconjugaison de T3 était un meilleur indicateur d'un effet hyperplasique de la thyroïde par rapport à celle de T4. Il a été comparé les effets d'un traitement avec le PCN inducteur de T3G et de TSH et le PCB (Arochlor 1254) qui n'induit pas d'augmentation du taux de TSH. Comme attendu le traitement avec le PCN est inducteur de tumeurs de la thyroïde en rapport avec une

augmentation de TSH mais le PCB est aussi un inducteur de tumeur, moins efficace, mais donc le mécanisme est indépendant de TSH (Vansell *et al.*, 2004).

La relation entre une augmentation de la clairance de T4-G et une diminution du taux sérique de T4 a été testé avec des rat KO pour la protéine d'export Mrp2, responsable de l'excrétion biliaire. Les rats sont traités par des inducteurs des UGT, le PB et le DMP904 (une pyrazolopyrimidine substituée). Il n'est pas trouvé de concordance entre la clairance biliaire, diminuée chez les rats Mrp2^{-/-} par comparaison aux WT, et la concentration de T4 observée chez les rats Mrp2^{-/-}. Ce résultat suggère que pour ces mutants d'autres facteurs contribuent à la diminution de la concentration sérique de T4 (Lecureux *et al.*, 2009).

Afin de documenter le mécanisme de toxicité hépatique du PB et PCN, des rats WT et transgéniques ont été exposés per os à 500 mg/kg/j PB (rats KO CAR) ou 100 mg/kg/j PCN (rats KO PXR) pendant 7 jours. Ce traitement induit une augmentation du poids relatif du foie associé à une hyperplasie des hépatocytes et de l'expression des ARNm des sous-familles CYP2B et CYP3A (Haines *et al.*, 2018). Des foyers d'hyperplasie des thyrocytes sont observés chez les rats WT traités avec le PCN et un effet moindre avec le PB. Ces effets sont absents chez les rats KO avec cependant un léger effet sur la réplication des hépatocytes pour les rats KO CAR est probablement en rapport avec à l'activation faible de PXR par le PB.

Si de nombreuses expérimentations chez le rat avaient pour but de tester l'induction d'enzymes hépatiques de phase II et l'effet sur T4, T3, TSH et la glande thyroïde, peu d'expérimentations équivalentes ont été réalisées chez la souris. Le PB, PCN, 3MC et PCB sont inducteurs d'enzymes du métabolisme chez la souris. Le PB, PCN et 3MC induisent une hépatomégalie bien que le 3MC soit moins efficace (Hood *et al.*, 2003). La corrélation est faible entre l'induction de T4G et la concentration sérique de T4 car si le PB et le PCN induisent une diminution, le PCN et le 3MC induisent une augmentation de T4. Une explication pour ce résultat est avancée avec l'augmentation de TSH qui stimule la synthèse des HT. Cette augmentation de TSH ne serait pas suffisante pour restaurer le taux de T4 dans le cas du PB et PCN. Par ailleurs, le 3MC et le PCB n'ont pas d'effets adverses sur la glande thyroïde. La stimulation de la thyroïde par la TSH est observée mais sans corrélation entre le taux de TSH et la prolifération des thyrocytes (Hood *et al.*, 2003).

En conclusion, il n'existe pas de lien univoque entre une induction des UGTs et un effet sur la thyroïde car le PB et le PCN augmentent la concentration de TSH alors que 3MC et PCB n'ont pas effet sur la TSH bien que les 4 agents réduisent la concentration sérique de T4 de façon équivalente (Barter and Klaassen, 1994).

Le PB augmente l'expression des UGT1As chez le rat, la souris et le hamster mais il n'est pas observé de diminution du taux sérique de T4 chez la souris et le hamster ce qui invalide un mécanisme d'action unique dépendant de la clairance augmentée de T4G (Kato *et al.*, 2010).

L'hépatomégalie n'est pas non plus un indicateur d'une augmentation de clairance de T4-G car une diminution de T4 peut aussi être due, outre les effets sur sa synthèse, à une accumulation dans les hépatocytes qui est observée chez les rongeurs (Richardson and Klaassen, 2010). L'explication d'une relation entre une hépatomégalie induite par une exposition aux SDHI et un effet hyperplasique/hypertrophique thyroïdien ne repose pas sur les résultats expérimentaux qui invalident cette AOP (adverse outcome pathway) dont le MIE (molecular initiating event) serait une augmentation des UGT. Même si les UGT et les SULT étaient dosées et en particulier les isoformes intervenant dans la conjugaison de T4 ou de T3, une diminution de concentration sérique de T4 ou T3 n'est pas automatiquement reliée à la clairance biliaire.

De plus, la possibilité d'un cycle entéro-hépatique dépendant de β -glucuronidases entériques a été décrit.

Pathologies de la glande thyroïde

Les pathologies qui affectent la glande thyroïde se traduisent fréquemment par des dysfonctionnements hormonaux. Ces dysfonctionnements peuvent conduire à une insuffisance ou absence de synthèse ou de libération des HT se traduisant par un tableau clinique d'hypothyroïdie. Dans certains cas l'origine est un déficit de stimulation hypophysaire, c'est-à-dire de TSH (hypothyroïdie centrale). Inversement, ils peuvent conduire à un excès de production ou sécrétion des HT se traduisant par un tableau clinique d'hyperthyroïdie.

Hypo- et hyperthyroïdie

Chez l'homme, on distingue l'hypothyroïdie clinique (lorsque des signes cliniques accompagnent une TSH augmenté au-delà de 4 μ U/ml et une T4 (libre ou totale) abaissée au-delà de la valeur normale inférieure de l'hypothyroïdie infra-clinique lorsque les signes cliniques sont minimes ou absents, avec une TSH comprise entre 4 et 10 μ U/ml et une T4 libre normale.

Il en est de même pour l'hyperthyroïdie clinique qui associe des signes cliniques francs à une TSH effondrée et à une T4 libre et/ou T3 libre augmentées au-delà de la valeur normale inférieure et l'hyperthyroïdie sous ou infra-clinique lorsque les signes cliniques sont minimes ou absents avec une TSH inférieure à la valeur normale et les T4 et T3 libres normales.

L'étiologie des dysthyroïdies est multiple. Des maladies ou affections auto-immunes (dont la thyroïdite de Hashimoto ou la thyroïdite atrophique post-ménopausique), des traitements (iode radioactif pour traiter une hyperthyroïdie, radiothérapie de la tête ou cou, médicaments à base de lithium ou d'antithyroïdiens de synthèse, chirurgie thyroïdienne, ...), une dysgénésie thyroïdienne au cours du développement (dont l'hypothyroïdie congénitale), des pathologies hypophysaires ou hypothalamiques ainsi que des carences en iode alimentaire peuvent entraîner une hypothyroïdie.

D'autres affections d'origine auto-immune (maladie de Graves-Basedow, thyroïdite du post-partum), des traitements médicamenteux (certains anti-arythmiques comme l'amiodarone), la présence de nodules thyroïdiens hypersécrétants (goitre multinodulaire, adénome) ou des inflammations virales peuvent entraîner une hyperthyroïdie. Il faut noter que certaines affections peuvent débiter par une hypothyroïdie et évoluer vers une hyperthyroïdie et inversement.

La prévalence des dysthyroïdies dans les pays avec un apport suffisant en iode est estimée pour l'hyperthyroïdie clinique entre 0,2 % et 1,3 %, alors que celle de l'hyperthyroïdie sous clinique est entre 1 % et 5 %. Concernant les hypothyroïdies franches, la prévalence dans la population générale est estimée à entre 0,2 % et 5,3 % en Europe et entre 0,3 % et 3,7 % aux États-Unis (Taylor *et al.*, 2018).

Chez le chien la prévalence de l'hypothyroïdie se situe entre 0.2 et 0.8% de la population canine (Dickson, 1993; Mooney, 2011). L'hypothyroïdie est l'une des pathologies endocriniennes les plus fréquente observée chez les chiens d'âge moyen (entre 4 et 10 ans) dont l'étiologie est primaire, très rarement secondaire et quasi-jamais tertiaire (Scarlett, 1994). La thyroïdite lymphocytaire est la cause sous-jacente dans de nombreux cas d'hypothyroïdie primaire avec une prédisposition héréditaire et qui représente 95% des cas d'hypothyroïdie

canine. Il s'agit d'un trouble à médiation immunitaire caractérisé histologiquement par une infiltration diffuse de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages dans la glande thyroïde (Graham *et al.*, 2007). La destruction progressive des follicules et la fibrose secondaire s'opère sur des mois voire des années avec des changements de taux d'HT observables lorsque plus de 60-70% du tissu thyroïdien est détruit. Cette affection présente des similitudes histopathologiques avec la thyroïdite d'Hashimoto chez les humains. Outre les dosages des HT, la recherche d'anticorps dirigés contre ces HT et la Tg peuvent être recherchés.

L'hypothyroïdie secondaire correspond à une altération d'origine hypophysaire avec une diminution de sécrétion de TSH en raison d'un envahissement néoplasique de l'antéhypophyse ou bien une malformation congénitale (Scott-Moncrieff and Guptill-Yoran, 2005).

L'hypothyroïdie tertiaire peut aussi être la conséquence d'une altération de libération de TRH par l'hypothalamus, cause très rare chez l'homme et non documentée chez le chien.

L'hyperthyroïdie chez le chien est une affection rare causée par une tumeur thyroïdienne (Feldman and Nelson, 2004). Seulement 10-20% des tumeurs thyroïdiennes sont hypersécrétantes correspondant généralement à des adénocarcinomes hautement métastatiques.

Tumeurs

L'incidence des tumeurs malignes de la thyroïde chez l'humain est d'environ 0.015% avec une fréquence très majoritaire pour les carcinomes papillaires qui sont très rarement observés chez les rongeurs. Les cancers de la thyroïde correspondent à :

- des cancers différenciés de souche folliculaire (> 90 % des cancers de la thyroïde) comportent des formes papillaires (80 % des cas et de bon pronostic), vésiculaires (10 % des cas) et des formes peu différenciées (10 % des cas) ;
- des cancers médullaires ou à cellules C (5 % des cancers de la thyroïde)
- des cancers anaplasiques (rares et de pronostic très péjoratif). Depuis 1990, l'incidence des cancers de la thyroïde a augmenté (+ 4,4 % par an chez l'homme et chez la femme). (HAS 2019 ; SpF/INCA/Francim 2019).

Les cancers de la thyroïde représentent environ 1 % des cancers incidents dans la population générale. Ils concernent principalement les femmes (76 %) et l'âge moyen au diagnostic est d'environ 50 ans. La prévalence du nodule thyroïdien est variable selon les moyens de dépistage. Il est plus fréquent chez la femme, le sujet âgé, les sujets vivant en zone de carence iodée ou ayant subi une irradiation de la région cervicale durant l'enfance mais ces nodules sont bénins dans plus de 90 % des cas.

Chez le chien les carcinomes et adénomes de la thyroïde représente de 1 à 4% des cancers (Bertolini *et al.*, 2017; Harari *et al.*, 1986). Les cancers sont classés en tumeurs folliculaires, papillaires, à cellules squameuses ou anaplasique. Les carcinomes représentent 60-90% des cancers de la thyroïde, la plupart des chiens étant cliniquement euthyroïdiens (Rosol and Meuten, 2016). Le cancer folliculaire est le plus commun, la plupart des tumeurs étant non fonctionnelles avec cependant moins de 25% des cas présentant des signes d'hyperthyroïdie (Liptak, 2007).

Le cancer de la thyroïde quant à son développement spontané, le processus métastatique orienté vers les poumons montrent des similarités avec les humains. Les altérations génétiques des cellules tumorales sont assez semblables à celles retrouvées chez les humains avec comme conséquence un modèle de xénogreffe chez la souris « nude » proposé en recherche translationnelle pour évaluer de nouvelles thérapeutiques (Hassan *et al.*, 2020).

Contrairement à l'incidence des tumeurs de la thyroïde chez l'homme ou le chien, l'incidence de tumeurs folliculaires de la thyroïde chez le rat (souche Fischer-344) est d'environ 2% (0.87% carcinome, 1% adénome) (Haseman *et al.*, 1998). En outre si chez le rat le carcinome folliculaire est la tumeur la plus fréquente, la forme papillaire est retrouvée dans 80% des cas chez l'homme.

4- Conclusion générale et perspectives

L'analyse des résultats expérimentaux sur les effets critiques des SDHI chez les rongeurs et parfois chez le chien aboutit au constat que 7 des 14 substances induisent un effet d'hypertrophie et/ou d'hyperplasie folliculaire de la thyroïde avec la possibilité pour certaines d'entre elles d'induire la formation d'adénomes ou adénosarcomes. Un effet des SDHI sur la thyroïde, hors effet critique, est retrouvé pour 12 des 14 substances actives.

Ces résultats d'une toxicité thyroïdienne sont associés à un effet hyperplasique et/ou hypertrophique hépatique considéré comme le mécanisme initiateur de la dérégulation de la fonction thyroïdienne. Ce MoA proposé initialement par McClain (McClain, 1995, 1989; McClain *et al.*, 1989) est repris dans les dossiers de demande d'autorisation pour les SDHI.

De nombreux résultats confirment les différences de réponse aux perturbateurs thyroïdiens entre le rat et l'humain avec comme conclusion que le modèle rongeur n'est pas pour cet effet extrapolable à l'humain. Dans le cas des SDHI, l'effet est considéré comme indirect via l'induction d'UGT conduisant à une augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes (HT).

Cependant, une augmentation de la TSH reliée ou non à une baisse du taux de T4 n'a pas pour seule origine une hyperplasie hépatique. Sur la base de 97 études OCDE conduites pour évaluer un effet reprotoxique associé ou non à une perturbation de la régulation thyroïdienne, 45 % des rats males montraient une hépatomégalie significative. Dans ce groupe 34% montraient une variation du taux de T4 (30% avec une diminution et 4% une augmentation de la concentration de la T4) (Beekhuijzen *et al.*, 2019). Il est mentionné une tendance entre l'hypertrophie hépatique et la baisse du taux de T4 mais avec une très faible valeur du coefficient $r^2 < 0.1$.

Malgré cette absence de relation entre hypertrophie/hyperplasie hépatique et hyperplasie/hypertrophie thyroïdienne, le minimum attendu pour une prise en compte de ce potentiel MoA est le suivant :

- dosages des UGT et SULT et démontrer que les isoformes impliquées dans la conjugaison des HT sont augmentées en expression et en activité. Ces dosages ne sont pas mentionnés dans la quasi-totalité des dossiers.
- dosages de TSH, FT4 et TT4 dans le sérum, dosages qui sont rarement effectués
- qualification et quantification des modifications histologiques de la glande thyroïde

Il est à noter la faiblesse de l'analyse réglementaire pour mettre en évidence les effets perturbateurs endocriniens d'agents chimiques. Il est souvent proposé de tester la

dérégulation de la fonction thyroïdienne dans le contexte d'une hypothyroïdie sur l'impact en neuro-développement (Kassotis *et al.*, 2020).

En raison des incertitudes accumulées et de plus en plus documentées sur le MoA proposé par les industriels pour expliquer la toxicité thyroïdienne, les conclusions d'un groupe d'experts EFSA sont les suivantes (Crivellente *et al.*, 2019) :

- Les substances induisant des modifications histopathologiques (hypertrophie et/ou hyperplasie et/ou néoplasie des cellules folliculaires) de la thyroïde, avec ou sans modification des taux circulants d'HT, présentent un risque d'insuffisance en hormones thyroïdiennes humaines chez les adultes avec pour les femmes enceintes un risque de perturbation du développement neurologique post-natal de la progéniture.
- Les substances modifiant les taux circulants de T3 et/ou de T4 sans modifications histopathologiques présentent cependant une préoccupation potentielle pour le développement neurologique du nouveau-né.
- En absence de données spécifiques à la substance prouvant le contraire, les humains et les rongeurs sont considérés comme ayant une sensibilité similaire à la perturbation de la thyroïde (y compris les cas où l'induction des enzymes hépatiques est responsable de l'augmentation de la clairance de la TH).

Il est donc clairement indiqué que les effets de dérégulation de la fonction thyroïdienne observée chez les rongeurs soient considérés *a minima* comme une alerte et requièrent des essais complémentaires.

Puisque la régulation de la fonction thyroïdienne, les concentrations et les demi-vies des HT sont sensiblement identiques entre les humains et les canidés, il est intéressant de comparer quand cela est possible, les résultats sur un effet perturbateur endocrinien après une exposition d'un an chez le chien avec ceux d'un an et/ou deux ans chez le rat.

Les discussions menées sur les expérimentations à conduire pour l'évaluation d'un effet perturbateur thyroïdien s'orientent désormais vers une diminution du nombre d'expérimentations *in vivo* avec cependant un intérêt de programmer des expérimentations chez les rongeurs qui testent les effets sur le neuro-développement et surtout vers le développement des essais *in vitro*.

A propos des expérimentations *in vivo* si le modèle rongeur montre ses limites (Bianco *et coll.*, 2014), d'autres modèles ont été développés principalement chez les poissons et les batraciens. Il est urgent et essentiel de poursuivre et développer des tests tirant profit des étapes de métamorphose et organogenèse chez les batraciens ou les poissons et pour des essais à court terme, de construire des modèles de génotype sauvage ou muté avec des gènes (Fini *et al.*, 2012; Morvan-Dubois *et al.*, 2008, 2013). Ainsi, le test de métamorphose AMA (OECD TG 231) chez les amphibiens intègre potentiellement tous les mécanismes possibles de perturbation de la fonction thyroïdienne puisque le paramètre étudié, la métamorphose, est un effet apical des HT. Le test XETA (Fini *et al.*, 2007) validé en 2019 (OECD TG 248), utilise une lignée transgénique de *X. laevis* Tg(thibz:eGFP), qui exprime le gène rapporteur GFP sous le contrôle d'un élément de réponse aux récepteurs thyroïdiens (TRE) du promoteur du gène TH/bZIP, un facteur de transcription hautement régulé par les HT (Furlow and Brown, 1999). Le test est basé sur des critères physiologiques de perturbation thyroïdienne tels qu'ils sont définis par l'essai OECD TG 231. Les têtards ont pour avantage de bénéficier de la grande conservation de la signalisation thyroïdienne chez les vertébrés et d'autre part de donner accès au suivi de l'organogenèse, un stade de développement difficile à suivre pour les modèles mammifères. La quantification des variations du signal GFP est indicatrice de l'altération de la biodisponibilité des HT.

Enfin, sur la base des résultats d'expérimentations, selon les lignes directrices OCDE menées par un CRO, il est montré une absence de relation entre le niveau de T4, le poids du foie et celui de la thyroïde ou encore les résultats d'histopathologie de la thyroïde (Beekhuijzen *et al.*, 2019). L'approche actuelle qui consiste à inclure les dosages des HT dans les études réglementaires *in vivo*, si elles sont utiles pour avancer sur la notion de MoA, ne fourniront pas les informations nécessaires pour évaluer la perturbation endocrinienne d'après Beekhuijzen *et coll.* En raison de la grande variabilité des concentrations sériques des hormones une différence statistiquement significative est souvent observée entre le groupe témoin et le groupe traité. Il est en conséquence recommandé de ne pas multiplier les expériences *in vivo* en incluant des paramètres supplémentaires, mais plutôt d'investir dans la standardisation et la validation des essais *in vitro* car ceux-ci fournissent des informations plus pertinentes et plus spécifiques sur le système endocrinien et les effets de potentiels perturbateurs chez l'homme (Beekhuijzen *et al.*, 2019).

Références

- Anyogu, D.C. *et al.* (2017) Effects of Prolonged Treatment With Co-trimoxazole on the Thyroid Gland, Liver, and Epididymal Sperm Reserve in Dogs. *Clin. Med. Insights Pathol.*, **10**, 1179555717742881.
- Astapova, I. and Hollenberg, A.N. (2013) The *in vivo* role of nuclear receptor corepressors in thyroid hormone action. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3876–3881.
- Barter, R.A. and Klaassen, C.D. (1994) Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 9–17.
- Barter, R.A. and Klaassen, C.D. (1992) UDP-glucuronosyltransferase inducers reduce thyroid hormone levels in rats by an extrathyroidal mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 36–42.
- Beekhuijzen, M. *et al.* (2019) A critical evaluation of thyroid hormone measurements in OECD test guideline studies: Is there any added value? *Reprod. Toxicol.*, **88**, 56–66.
- Bergh, J.J. *et al.* (2005) Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, **146**, 2864–2871.
- Bernal, J. (2017) Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development. *J. Endocrinol.*, **232**, R83–R97.
- Bertolini, G. *et al.* (2017) Incidental and nonincidental canine thyroid tumors assessed by multidetector row computed tomography: a single-centre cross sectional study in 4520 dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound Off. J. Am. Coll. Vet. Radiol. Int. Vet. Radiol. Assoc.*, **58**, 304–314.
- Bianco, A.C. *et al.* (2019) Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocr. Rev.*, **40**, 1000–1047.
- Bock, K.W. (2011) From differential induction of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver to characterization of responsible ligand-activated transcription factors, and their multilevel crosstalk in humans. *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 9–16.
- Braeuning, A. *et al.* (2014) Phenobarbital-mediated tumor promotion in transgenic mice with humanized CAR and PXR. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, **140**, 259–270.
- Bregengård, C. *et al.* (1987) Relationships between serum thyrotropin, serum free thyroxine (T4), and 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and the daily T4 and T3 production rates in euthyroid patients with multinodular goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65**, 258–261.

-
- Brent, G.A. (2012) Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.*, **122**, 3035–3043.
- Capen, C.C. (1997) Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland. *Toxicol. Pathol.*, **25**, 39–48.
- Casas, F. *et al.* (1999) A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7913–7924.
- Chanoine, J.P. *et al.* (1993) The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *J. Clin. Invest.*, **91**, 2709–2713.
- Charalambous, M. *et al.* (2016) Antiepileptic drugs' tolerability and safety – a systematic review and meta-analysis of adverse effects in dogs. *BMC Vet. Res.*, **12**, 79.
- Christian, M.S. and Trenton, N.A. (2003) Evaluation of thyroid function in neonatal and adult rats: The neglected endocrine mode of action. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 2055–2068.
- Constantino-Casas, P. *et al.* (1996) A case report and review: the gross, histological and immunohistochemical characteristics of a carcinoma of ectopic thyroid in a dog. *Br. Vet. J.*, **152**, 669–672.
- Crivellente, F. *et al.* (2019) Establishment of cumulative assessment groups of pesticides for their effects on the thyroid. *EFSA J.*, **17**, e05801.
- Curran, P.G. and DeGroot, L.J. (1991) The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr. Rev.*, **12**, 135–150.
- Daminet, S. *et al.* (1999) Short-term influence of prednisone and phenobarbital on thyroid function in euthyroid dogs. *Can. Vet. J.*, **40**, 411–415.
- Darras, V.M. and Van Herck, S.L.J. (2012) Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans. *J. Endocrinol.*, **215**, 189–206.
- Darrouzet, E. *et al.* (2014) The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 244–253.
- Davis, P.J. *et al.* (2016) Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **12**, 111–121.
- Davis, P.J. *et al.* (2021) Nongenomic Actions of Thyroid Hormone: The Integrin Component. *Physiol. Rev.*, **101**, 319–352.
- Dickson, W.M. (1993) Endocrine gland. In, *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 11 th ed. Cornell University Press, Ithaca, pp. 640–645.
- Döhler, K.D. *et al.* (1979) The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol. Ther. [B]*, **5**, 305–318.
- Elcombe, C.R. *et al.* (2014) Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Crit. Rev. Toxicol.*, **44**, 64–82.
- Feldman, E.C. and Nelson, R.W. (2004) The thyroid gland. In, *Canine and feline endocrinology and reproduction.*, pp. 86–142.
- Findlay, K.A. *et al.* (2000) Characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase-catalyzing thyroid hormone glucuronidation in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 2879–2883.
- Fini, J.-B. *et al.* (2007) An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 5908–5914.
- Fini, J.B. *et al.* (2012) Thyroid Hormone Signaling in the *Xenopus laevis* Embryo Is Functional and Susceptible to Endocrine Disruption. *Endocrinology*, **153**, 5068–5081.
-

-
- Flamant, F. *et al.* (2007) Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, **21**, 321–333.
- Furlow, J.D. and Brown, D.D. (1999) In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*, **13**, 2076–2089.
- Gamage, N. *et al.* (2006) Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicol. Sci.*, **90**, 5–22.
- Gieger, T.L. *et al.* (2000) Thyroid function and serum hepatic enzyme activity in dogs after phenobarbital administration. *J. Vet. Intern. Med.*, **14**, 277–281.
- Graham, P.A. *et al.* (2007) Etiopathologic findings of canine hypothyroidism. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **37**, 617–631, v.
- Haines, C. *et al.* (2018) Comparison of the hepatic and thyroid gland effects of sodium phenobarbital in wild type and constitutive androstane receptor (CAR) knockout rats and pregnenolone-16 α -carbonitrile in wild type and pregnane X receptor (PXR) knockout rats. *Toxicology*, **400–401**, 20–27.
- Harari, J. *et al.* (1986) Clinical and pathologic features of thyroid tumors in 26 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **188**, 1160–1164.
- Haseman, J.K. *et al.* (1998) Spontaneous Neoplasm Incidences in Fischer 344 Rats and B6C3F1 Mice in Two-Year Carcinogenicity Studies: A National Toxicology Program Update. *Toxicol. Pathol.*, **26**, 428–441.
- Hassan, B.B. *et al.* (2020) Canine Thyroid Cancer: Molecular Characterization and Cell Line Growth in Nude Mice. *Vet. Pathol.*, **57**, 227–240.
- Hichri, M. (2018) Étude omique de la régulation de la thyroïde par l'iode et du rôle de SLC5A8 dans la thyroïde. *Univ. Côte Azur Thèse Dr.*
- Hoh, W.-P. and Oh, T.-H. (2006) Circadian variations of serum thyroxine, free thyroxine and 3,5,3'triiodothyronine concentrations in healthy dogs. *J. Vet. Sci.*, **7**, 25–29.
- Hood, A. *et al.* (1999) Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid-follicular cell proliferation, hyperplasia, and hypertrophy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160**, 163–170.
- Hood, A. *et al.* (2003) Induction of T(4) UDP-GT activity, serum thyroid stimulating hormone, and thyroid follicular cell proliferation in mice treated with microsomal enzyme inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **188**, 6–13.
- Hood, Alan and Klaassen, C.D. (2000) Differential Effects of Microsomal Enzyme Inducers on in Vitro Thyroxine (T4) and Triiodothyronine (T3) Glucuronidation. *Toxicol. Sci.*, **55**, 78–84.
- Hood, A. and Klaassen, C.D. (2000) Effects of microsomal enzyme inducers on outer-ring deiodinase activity toward thyroid hormones in various rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **163**, 240–248.
- IARC (2001) Some Thyrotropic Agents.
- Janssen, S.T. and Janssen, O.E. (2017) Directional thyroid hormone distribution via the blood stream to target sites. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **458**, 16–21.
- Kaptein, E.M. *et al.* (1994) Thyroid hormone metabolism. A comparative evaluation. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **24**, 431–466.
- Kassotis, C.D. *et al.* (2020) Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **8**, 719–730.
- Kato, Y. *et al.* (2010) A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by phenobarbital in rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **249**, 238–246.
-

-
- Kato, Y. *et al.* (2008) Hepatic UDP-glucuronosyltransferases responsible for glucuronidation of thyroxine in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **36**, 51–55.
- Korevaar, T.I.M. *et al.* (2016) Association of maternal thyroid function during early pregnancy with offspring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **4**, 35–43.
- Korevaar, T.I.M. *et al.* (2018) Clinical associations of maternal thyroid function with foetal brain development: Epidemiological interpretation and overview of available evidence. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, **89**, 129–138.
- Lake, B.G. (2018) Human relevance of rodent liver tumour formation by constitutive androstane receptor (CAR) activators. *Toxicol. Res.*, **7**, 697–717.
- Lanni, A. *et al.* (2005) 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **19**, 1552–1554.
- Larsson, M. (1981) Evaluation of a human TSH radioimmunoassay as a diagnostic test for canine primary hypothyroidism. *Acta Vet. Scand.*, **22**, 589–591.
- Larsson, M. *et al.* (1985) Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **58**, 360–375.
- Lecureux, L. *et al.* (2009) Hepatobiliary disposition of thyroid hormone in Mrp2-deficient TR- rats: reduced biliary excretion of thyroxine glucuronide does not prevent xenobiotic-induced hypothyroidism. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, **108**, 482–491.
- Lee, G.H. (2000) Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Pathol.*, **28**, 215–225.
- Liptak, J.M. (2007) Canine Thyroid Carcinoma. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, **22**, 75–81.
- Liu, J. *et al.* (1995) Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 977–985.
- Mariotti, S. and Beck-Peccoz, P. (2000) Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. In, Feingold, K.R. *et al.* (eds), *Endotext*. MDTText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- McClain, R.M. (1995) Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutat. Res.*, **333**, 131–142.
- McClain, R.M. *et al.* (1989) The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 216–228.
- McClain, R.M. (1989) The significance of hepatic microsomal enzyme induction and altered thyroid function in rats: implications for thyroid gland neoplasia. *Toxicol. Pathol.*, **17**, 294–306.
- Mooney, C.T. (2011) Canine hypothyroidism: a review of aetiology and diagnosis. *N. Z. Vet. J.*, **59**, 105–114.
- Moore, L.B. *et al.* (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15122–15127.
- Morvan-Dubois, G. *et al.* (2013) Is thyroid hormone signaling relevant for vertebrate embryogenesis? *Curr. Top. Dev. Biol.*, **103**, 365–396.
- Morvan-Dubois, G. *et al.* (2008) *Xenopus laevis* as a model for studying thyroid hormone signalling: from development to metamorphosis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **293**, 71–79.
- Noyes, P.D. *et al.* (2019) Evaluating Chemicals for Thyroid Disruption: Opportunities and Challenges with in Vitro Testing and Adverse Outcome Pathway Approaches. *Environ. Health Perspect.*, **127**, 95001.
- OECD (2006) Detailed review paper on thyroid hormone disruption assays.

-
- OECD (2014) New Scoping Document on in vitro and ex vivo Assays for the Identification of Modulators of Thyroid Hormone Signalling | en | OECD.
- OECD (2018) Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption | en | OECD.
- Ohnhaus, E. and Studer, H. (1983) A link between liver microsomal enzyme activity and thyroid hormone metabolism in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **15**, 71–76.
- Oppenheimer, J.H. (1968) Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. *N. Engl. J. Med.*, **278**, 1153–1162.
- Pancier, D.L. (1998) Canine hypothyroidism. In, *Manual of small animal endocrinology*. United Kingdom, pp. 103–113.
- Paradis, M. *et al.* (1996) Serum-free thyroxine concentrations, measured by chemiluminescence assay before and after thyrotropin administration in healthy dogs, hypothyroid dogs, and euthyroid dogs with dermatopathies. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.*, **37**, 289–294.
- Pelkonen, O. *et al.* (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.*, **82**, 667–715.
- Refetoff, S. (2015) Thyroid Hormone Serum Transport Proteins. In, Feingold, K.R. *et al.* (eds), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Rice, J.M. *et al.* (1989) Comparative transplacental carcinogenesis by directly acting and metabolism-dependent alkylating agents in rodents and nonhuman primates. *IARC Sci. Publ.*, 17–34.
- Richardson, T.A. and Klaassen, C.D. (2010) Role of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B2 in metabolism of triiodothyronine: effect of microsomal enzyme inducers in Sprague Dawley and UGT2B2-deficient Fischer 344 rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, **116**, 413–421.
- Richardson, V.M. *et al.* (2014) In vitro metabolism of thyroxine by rat and human hepatocytes. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, **44**, 391–403.
- Roques, B.B. *et al.* (2013) The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 997–1039.
- Rosol, T.J. and Meuten, D.J. (2016) Tumors of the endocrine glands. In, *Wiley.com*, Tumors in Domestic Animals. pp. 766–833.
- Runge-Morris, M. and Kocarek, T.A. (2009) Regulation of sulfotransferase and UDP-glucuronosyltransferase gene expression by the PPARs. *PPAR Res.*, **2009**, 728941.
- Runge-Morris, M. and Kocarek, T.A. (2005) Regulation of sulfotransferases by xenobiotic receptors. *Curr. Drug Metab.*, **6**, 299–307.
- Sachana, M. *et al.* (2021) The potential of mechanistic information organised within the AOP framework to increase regulatory uptake of the developmental neurotoxicity (DNT) in vitro battery of assays. *Reprod. Toxicol. Elmsford N*, **103**, 159–170.
- Savu, L. *et al.* (1991) A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim. Biophys. Acta*, **1097**, 19–22.
- Scarlett, J.M. (1994) Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **24**, 477–486.
- Scott-Moncrieff, J. and Guptill-Yoran, L. (2005) Hypothyroidism. In, *Textbook of Veterinary Internal Medicine.*, pp. 1535–1544.
- Sirakov, M. and Plateroti, M. (2011) The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1812**, 938–946.

-
- Sueyoshi, T. *et al.* (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6043–6046.
- Szkudlinski, M.W. *et al.* (2002) Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.*, **82**, 473–502.
- Tanaka, T. *et al.* (1987) Enhancement of dimethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in hamsters by subsequent administration of carbon tetrachloride but not phenobarbital or p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane. *Carcinogenesis*, **8**, 1171–1178.
- Taylor, E. and Heyland, A. (2017) Evolution of thyroid hormone signaling in animals: Non-genomic and genomic modes of action. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **459**, 14–20.
- Taylor, P.N. *et al.* (2018) Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 301–316.
- Thompson, C.C. and Potter, G.B. (2000) Thyroid hormone action in neural development. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991*, **10**, 939–945.
- Tong, Z. *et al.* (2007) In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **35**, 2203–2210.
- Valcárcel-Hernández, V. *et al.* (2022) Deficient thyroid hormone transport to the brain leads to impairments in axonal caliber and oligodendroglial development. *Neurobiol. Dis.*, **162**, 105567.
- Vansell, N.R. *et al.* (2004) Promotion of thyroid tumors in rats by pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN) and polychlorinated biphenyl (PCB). *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, **81**, 50–59.
- Vansell, N.R. and Klaassen, C.D. (2002) Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **30**, 240–246.
- Vella, K.R. and Hollenberg, A.N. (2017) The actions of thyroid hormone signaling in the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **458**, 127–135.
- Visser, T.J. *et al.* (1998) Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 279–291.
- Visser, T.J. (1996) Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med. Austriaca*, **23**, 10–16.
- Visser, W.E. *et al.* (2008) Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, **19**, 50–56.
- Whysner, J. *et al.* (1996) Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: Enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.*, **71**, 153–191.
- Williams, G.R. (2008) Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J. Neuroendocrinol.*, **20**, 784–794.
- Wu, S.-Y. *et al.* (2005) Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.*, **15**, 943–958.
- Zoeller, R.T. *et al.* (2007) General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit. Rev. Toxicol.*, **37**, 11–53.
- Zoeller, R.T. and Rovet, J. (2004) Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J. Neuroendocrinol.*, **16**, 809–818.

Contribution personnelle : Hormones thyroïdiennes et fonction hépatique

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Bernard Salles

Co-signataire : Thomas Claudepierre

Le foie et la thyroïde interagissent en empruntant de nombreuses voies de régulation. Le foie joue un rôle important dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes (HT) puisqu'il intervient dans

- la synthèse des transporteurs sériques des HT (thyroxine binding protein (TBG), transthyrétine (TTR), albumine),
- l'excrétion des hormones thyroïdiennes par sulfo- ou glucuronoconjugaison,
- la production de l'hormone active T3 par déiodation de T4. La déiodinase D1 est principalement exprimée dans le foie et le rein et rend compte de 30 à 40% de la production extra-thyroïdienne de T3 (Malik and Hogson, 2002).

Ainsi, la fonction hépatique contribue à la concentration sérique des hormones thyroïdiennes. Le fonctionnement normal de la fonction thyroïdienne requise pour la croissance et le développement des organismes ainsi que le métabolisme énergétique cellulaire est dépendant d'interactions contrôlées de l'axe foie-thyroïde.

Réciproquement, les HT via une régulation génomique (récepteurs TR α et majoritairement TR β) ou non génomique influencent de nombreuses voies métaboliques en agissant en premier lieu sur le catabolisme des carbohydrates et des lipides. Sur la base de cette mobilisation des lipides, les HT au niveau hépatique stimulent la synthèse des acides gras. En outre, les HT modulent la croissance et différenciation des cellules hépatiques ainsi que le métabolisme de nombreuses substances tels que les acides biliaires et la bilirubine.

Le dysfonctionnement de la régulation thyroïdienne influence la fonction hépatique et réciproquement illustré par plusieurs associations cliniques entre pathologies de la thyroïde et du foie (Huang and Liaw, 1995; Piantanida et al., 2020) De plus des patients atteints de thyroïdite subaiguë ou d'hyperthyroïdie et qui présentent des valeurs anormales de constantes biochimiques hépatiques peuvent retrouver des valeurs normales en rapport avec l'amélioration de la fonction thyroïdienne (Association française des malades de la thyroïde). Réciproquement, des patients atteints d'une maladie hépatique chronique et présentant un dysfonctionnement de la régulation thyroïdienne retrouvent des valeurs normales des tests hormonaux en rapport avec l'efficacité du traitement de la maladie hépatique.

Comme les constantes biochimiques de la fonction hépatique en expérimentation animale, en médecine humaine ou vétérinaire sont parfois associées à une dysthyroïdie, ces cas seront discutés après un bref rappel sur la signification de ces constantes biochimiques (Lawrence and Steiner, 2017; Johnston, 1999).

1- Les enzymes hépatiques

Les maladies du foie sont souvent diagnostiquées d'après des valeurs anormales d'un ou plusieurs paramètres biochimiques qui correspondent à des biomarqueurs du système ou de la fonction hépatique (Giannini et al., 2005)

1.1- Les transaminases

L'alanine aminotransférase (ALT) est essentiellement présente dans le cytoplasme des hépatocytes et accessoirement dans celui des muscles et du rein. Sa demi-vie d'élimination plasmatique est d'environ 45 h.

L'aspartate aminotransférase (AST) présente une distribution tissulaire plus large avec une expression principalement dans le foie (90% dans les mitochondries), mais aussi dans le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le cerveau. Le dosage sanguin estime la partie cytoplasmique de cette enzyme, soit environ 10% du total. Sa demi-vie d'élimination plasmatique est d'environ 17 heures. Cette différence de demi-vie entre ALT et AST explique que l'AST se normalise plus rapidement que l'ALT dans les situations aiguës. Le taux normal chez les humains se situe entre 5 et 30 UI/l pour l'ALT et entre 5 et 25 UI/l pour l'AST.

Ce sont les marqueurs biologiques les plus spécifiques d'une atteinte hépatique et de la nécrose hépatocytaire. La spécificité est plus marquée pour les ALT, conséquence de leur distribution essentiellement hépatique dans l'organisme. Si les transaminases sont des marqueurs de cytolysse, elles sont peu spécifiques de la fonction hépatique et de la gravité de l'atteinte. D'autres paramètres biologiques sont utiles dans l'interprétation du bilan hépatique, afin de différencier cytolysse et cholestase et d'évaluer plus précisément la fonction hépatique.

1.2- Phosphatases alcalines et gamma glutamyl-transpeptidases

Les phosphatases alcalines (ALP) et les gamma glutamyl-transpeptidases (γ GT) sont les marqueurs classiquement suivis pour évaluer une cholestase qui correspond aux perturbations des mécanismes d'excrétion biliaire. Les phosphatases alcalines augmentent en cas de cholestase, mais également au cours de la croissance, de la grossesse et en cas de lésions osseuses.

La valeur du dosage sérique de la γ GT est peu spécifique, mais très sensible en cas de cholestase. Elle peut être élevée dans toutes les maladies hépatobiliaires mais aussi dans l'éthylisme chronique, suite à la prise de médicaments inducteurs, au cours de maladies non digestives, de l'obésité, de l'hyperlipémie, du diabète ou quelquefois sans cause décelable. En pratique, son élévation atteste de l'origine hépatique d'une élévation des phosphatases alcalines. Les ALP et les γ GT sont toutes les deux élevées dans 90% des cas lors d'une cholestase.

Les enzymes AST, ALT, γ GT et ALP permettent de classer les perturbations du bilan hépatique en cholestase ou cytolysse. Une prédominance sur les transaminases signe une cytolysse hépatique, alors qu'une franche prédominance sur les γ GT et ALP est plutôt indicateur de cholestase. Aucune de ces anomalies ne renseigne sur l'existence d'une insuffisance hépatocellulaire qui nécessite un dosage du taux de prothrombine (TP), de l'albumine, la bilirubine et du facteur V.

1.3- Bilirubine

La bilirubine est un produit de la dégradation de l'hémoglobine. Son excrétion est réalisée de façon prédominante par sécrétion dans la bile. La bilirubine est solubilisée suite à une réaction

de glucurono-conjugaison hépatique. Elle est en conséquence présente sous deux formes dans le sérum :

- une forme directe qui correspond à la forme conjuguée (soluble)
- une forme indirecte qui correspond à la forme non conjugué (insoluble).

Plusieurs pathologies primitives ou acquises peuvent entraîner une augmentation de la bilirubine comme une hémolyse, une obstruction des canaux biliaires, une cholestase intra-hépatique, une hépatite ou une cirrhose (Green and Flamm, 2002). Le dosage de bilirubine est un élément important dans l'analyse d'un bilan hépatique perturbé : c'est un marqueur de cholestase mais aussi d'insuffisance hépatocellulaire. C'est cependant un marqueur tardif de défaillance hépatique, car 10% de tissu hépatique sain suffisent à maintenir des taux normaux de bilirubine

1.4- Temps de prothrombine, facteur V, albumine

Ces tests servent à évaluer la gravité d'une pathologie hépatique. Le temps de prothrombine (TP, mesure du temps de coagulation du plasma citraté) est un marqueur spécifique de la fonction hépatique en absence de carence en vitamine K ou de traitement anti-coagulant. Le TP est le reflet de la synthèse hépatique des facteurs de coagulation I, II, V, VII, et X (Dufour et al., 2000). Il ne devient anormal que lorsque 80% de la capacité de synthèse hépatique est altérée. Le TP est l'un des trois paramètres biologiques du score d'évolution de la cirrhose avec l'albumine et la bilirubine.

Le facteur V est un facteur de coagulation non dépendant de la vitamine K, synthétisé par le foie. C'est un reflet spécifique de la fonction hépatocellulaire, surtout dans les situations de carence en vitamine K ou de prise d'anticoagulants oraux.

L'albumine est un marqueur de la fonction hépatique moins spécifique. Cette protéine, la plus abondante du sérum, est synthétisée uniquement par le foie. Une diminution de son taux ne reflète pas seulement une pathologie hépatique mais peut aussi être le marqueur d'une perte de protéine (syndrome néphrotique, entéropathie...), d'un catabolisme protéique, d'une corticothérapie ou d'une malnutrition.

Les perturbations légères ou modérées du bilan biochimique hépatique rend compte de nombreuses étiologies telles que l'hémochromatose génétique, la prise de certains médicaments, un syndrome métabolique et obésité, une infection virale, une intoxication mais aussi génétiques, musculaires, dysimmunitaires et dysthyroïdienne. Dans le cas des dysthyroïdies il est rapporté depuis plus de trente ans des variations des marqueurs biochimiques hépatiques.

2- Dysthyroïdie et bilan hépatique

Les fonctions des HT sont médiées par des actions génomiques avec l'induction de gènes présentant des séquences de reconnaissance TRE ou des actions non génomiques. Les perturbations de la signalisation des HT provoquent un dysfonctionnement de nombreux organes et sont étroitement associées à plusieurs maladies. Le foie représente l'une des principales cibles des HT, et les taux des HT sont étroitement corrélés avec plusieurs maladies hépatiques dans un spectre allant de la stéatose hépatique au carcinome hépato-cellulaire

2.1- Hypothyroïdie

Les manifestations cliniques d'une atteinte hépatique au cours de l'hypothyroïdie sont rares. Une hépatomégalie modérée est l'anomalie la plus fréquemment observée. Cependant, l'élévation des constantes prédomine en général sur l'AST et dans la plupart des cas cette perturbation enzymatique est d'origine musculaire (Huang and Liaw, 1995). L'hypothyroïdie est responsable de perturbations métaboliques pouvant induire une stéatose et il existe un lien entre l'hépatite auto-immune et les pathologies thyroïdiennes auto-immunes, et entre la cirrhose biliaire primitive et hypothyroïdie (Huang and Liaw, 1995). Une cholestase peut s'observer dans de rares cas et dont le mécanisme semble résulter d'une diminution de l'excrétion biliaire de bilirubine et des acides biliaires. D'après des études expérimentales d'induction d'une hypothyroïdie l'activité de la bilirubine UDP-glucuronyltransferase est diminuée avec pour conséquence une réduction d'excrétion de bilirubine (Malik and Hogson, 2002). L'hypothyroïdie subclinique représente un facteur important associés au développement de la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Ce constat peut avoir implications cliniques importantes pour le traitement de la maladie et la prévention (Xu et al., 2012). Ainsi le ciblage sélectif avec des agonistes des TRs peuvent présenter une stratégie de traitement des pathologies hépatiques, telles que les maladies métaboliques, la stéatose hépatique voire le carcinome hépatocellulaire (Chi et al., 2013).

Plus récemment, chez des sujets dont la fonction thyroïdienne était diminuée, une proportion plus élevée de patients atteints d'hypothyroïdie subclinique présentaient une NASH (Non-Alcoholic Steato Hepatitis) et une fibrose avancée associée par rapport aux patients avec une fonction thyroïdienne basse-normale (Kim et al., 2018). Des souris C57BL/6 nourries avec une diète « high fat » inductrice d'une stéato-hépatite ont ensuite reçu un nouvel agoniste du TR β (TG68). Les résultats montrent que le traitement avec le TG68 a entraîné une réduction du poids du foie, de la stéatose hépatique, des transaminases sériques et de la circulation triglycérides. Ce nouvel agoniste TR β exerce un effet anti-stéatogène couplé à une amélioration des lésions hépatiques en absence d'effets secondaires extra-hépatiques, suggérant qu'il peut représenter un outil thérapeutique pour le traitement de la NAFLD (Caddeo et al., 2021).

2.2- Hyperthyroïdie

Les effets d'une hyperthyroïdie sur la fonction hépatique sont relativement fréquents. Les caractéristiques cliniques de l'hyperthyroïdie sont diverses, impliquant de nombreux systèmes de régulation. Les lésions hépatiques induites par une thyrotoxicose sont relativement courantes et peuvent être décrites comme une atteinte hépatique ou un processus cholestatique. L'état hyper-métabolique caractéristique de l'hyperthyroïdie pourrait augmenter la demande hépatique en oxygène suite à l'augmentation de l'activité mitochondriale et participer à l'effet hépatotoxique.

L'atteinte hépatique est associée à une augmentation du taux d'AST et plus fréquemment d'ALT. Pour les patients avec cholestase, la majorité d'entre eux présentent une élévation de l'ALP. Comme ce biomarqueur n'est pas spécifique d'une atteinte hépatique, il est important de doser la γ GT et la bilirubine comme indicateurs de la cholestase. La maladie de Graves-Basedow, la cause la plus fréquente de l'hyperthyroïdie, est une maladie auto-immune induite par la sécrétion d'anticorps (anti - récepteur de la TSH) stimulant la production des HT. Cette maladie est souvent associée à un bilan hépatique anormal, et le plus souvent avec des niveaux élevés de γ GT et d'ALP. Le profil de l'atteinte hépatique est plus directement lié au degré de thyrotoxicose qu'aux niveaux des auto-anticorps (Biscoveanu and Hasinski, 2000; Hsieh et al., 2019).

Des études chez des rats induits par une exposition durant 5 jours de L-thyroxine à 0.0012% dans l'eau de boisson concluent à des augmentations significatives des dosages des AST, ALT, ALP, LDH et γ GT (Messarah et al., 2010). Cet effet hépatotoxique est associé à une stimulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène.

3- Conclusion

Une relation complexe existe entre la thyroïde et le foie. Les anomalies des enzymes hépatiques sériques observées dans l'hypothyroïdie peuvent être liées à une altération du métabolisme des lipides, à une stéatose hépatique ou à une myopathie induite par l'hypothyroïdie. L'hypothyroïdie sévère peut avoir des caractéristiques biochimiques et cliniques, telles que l'hyperammoniémie et l'ascite, imitant celles de l'insuffisance hépatique.

Les tests de la fonction hépatique sont souvent anormaux également dans l'hyperthyroïdie, en raison du stress oxydatif, de la cholestase ou de l'activité ostéoblastique accrue.

En conclusion, l'atteinte hépatique au cours des maladies thyroïdiennes est fréquente, en particulier chez les malades hyperthyroïdiens. Les signes cliniques d'hépatopathie sont généralement frustes, mais une perturbation de l'enzymologie hépatique est couramment observée, de telle sorte que, devant toute cytololyse ou cholestase d'origine inexplicée, une dysthyroïdie doit être recherchée.

Bibliographie

- Association française des malades de la thyroïde : <https://www.asso-malades-thyroide.fr/wordpress/category/accueil/>
- Biscoveanu, M. and Hasinski, S. (2000) Abnormal results of liver function tests in patients with Graves' disease. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.*, 6, 367–369.
- Caddeo, A. et al. (2021) TG68, a Novel Thyroid Hormone Receptor- β Agonist for the Treatment of NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 13105.
- Chi, H.C. et al. (2013) Molecular functions of thyroid hormones and their clinical significance in liver-related diseases. *BioMed Res. Int.*, 2013, 601361.
- Dufour, D.R. et al. (2000) Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.*, 46, 2027–2049.
- Giannini, E.G. et al. (2005) Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, 172, 367–379.
- Green, R.M. and Flamm, S. (2002) AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*, 123, 1367–1384.
- Hsieh, A. et al. (2019) Liver enzyme profile and progression in association with thyroid autoimmunity in Graves' disease. *Endocrinol. Diabetes Metab.*, 2, e00086.
- Huang, M.J. and Liaw, Y.F. (1995) Clinical associations between thyroid and liver diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10, 344–350.
- Johnston, D.E. (1999) Special considerations in interpreting liver function tests. *Am. Fam. Physician*, 59, 2223–2230.
- Kim, D. et al. (2018) Subclinical Hypothyroidism and Low-Normal Thyroid Function Are Associated With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.*, 16, 123-131.e1.

-
- Lawrence, Y.A. and Steiner, J.M. (2017) Laboratory Evaluation of the Liver. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 47, 539–553.
- Malik, R. and Hogson, H. (2002) The relationship between the thyroid gland and the liver. *QJM Int. J. Med.*, 95, 559–569.
- Messarah, M. et al. (2010) Influence of thyroid dysfunction on liver lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.*, 62, 301–310.
- Xu, L. et al. (2012) Impact of subclinical hypothyroidism on the development of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective case-control study. *J. Hepatol.*, 57, 1153–1154.

Contribution personnelle : Analyse de la bibliographie sur la neurotoxicité de l'acide 3-nitropropionique, du malonate et du 2-thenoyltrifluoroacétone, des inhibiteurs pharmacologiques de la SDH

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Thierry Baron

Co-signataires : Sylvie Bortoli, Laurence Huc, Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

L'acide 3-nitropropionique (3-NP), inhibiteur pharmacologique irréversible de la SDH, est le composé actif initialement identifié comme responsable de foyers de pathologie des ganglions de la base due à l'ingestion de sucre de canne infecté par le champignon *Arthrinium fungus* en Chine, se manifestant notamment par une dystonie (He et al., 1995)[1].

De très nombreux travaux expérimentaux chez le rat ou la souris ont ainsi imposé le 3-NP comme un modèle expérimental de maladies neurodégénératives affectant le striatum telles la maladie de Huntington (MH) ou la dégénérescence nigro-striée (Brouillet et al., 2002 ; Fernagut et al., 2002)[2,3].

Le modèle d'exposition au 3-NP a aussi fait l'objet de nombreux travaux chez des primates non humains relatifs à la maladie de Huntington (MH), pour laquelle ce modèle est bien caractérisé et validé. Par exemple une étude par Dautry et al., 1999 chez le babouin mâle montre une diminution de N-acétylaspartate (NAA), créatine et choline, témoignant d'un effet métabolotoxique dans le striatum [4]. Alors que l'inhibition de SDH affecte toute les régions cérébrales après administration systémique, la diminution sélective de NAA ou de créatine dans le striatum montre sa vulnérabilité préférentielle.

Le modèle d'exposition au 3-NP chez le rat a permis de montrer que des marqueurs biochimiques de toxicité mitochondriale, y compris sériques, peuvent être identifiables, y compris dans des tissus ou fluides périphériques. Ainsi une étude de Baumgart et al., 2016 réalisée chez le rat montre une inhibition de la SDH sans troubles neurologiques détectés après une semaine, et un effet généralement dose-dépendant sur les mtDNA ou des microRNAs dans le rein, le muscle squelettique (quadriceps) ou le sérum, permettant de définir des biomarqueurs précoces de mitotoxicité, plus sensibles que la mesure des ROS ou de la respiration mitochondriale [5].

Chez le rat mâle Fischer 344, une souche de rat très sensible à l'hypoxie associée, le 3-NP entraîne des déficits moteurs précoces et durables (Akopian et al., 2012) impliquant des altérations précoces de la plasticité synaptique cortico-striatale, sans perte neuronale [6]. Cette atteinte synaptique pourrait contribuer, en l'absence de pertes neuronales, aux déficits moteurs et la récupération par restauration de la fonction synaptique est lente. Une atteinte aiguë et à long terme des synapses nigro-striatales dopaminergiques a été montrée en réponse à l'hypoxie liée à une exposition à faible dose au 3-NP (Crawford et al., 2011)[7].

Chez la souris, Saydoff et al., 2003 montrent notamment que le 3-NP entraîne une diminution de l'activité des complexes II et III, une altération des neurones et une diminution de l'activité des souris et de leurs performances motrices évaluées par le test Rotarod [8].

Blum et al., 2001 ont étudié chez le rat Lewis mâle la topologie des lésions striatales et leurs relations avec la diminution d'activité SDH après administration de 3-NP [9]. Il y a une

diminution significative de l'activité SDH (59 à 81%) dans toutes les zones du cerveau (striatum et cortex cérébral) et la diminution d'activité SDH est maximale dans la partie latérale du striatum coïncidant avec les lésions observées à l'examen histologique. Dans une étude ultérieure, Blum et al., 2004 montrent, qu'en contraste avec la perte spécifique des terminaisons neuronales dopaminergiques, on observe la même densité de neurones immunoréactifs pour la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme impliquée dans la synthèse des neurotransmetteurs catécholamines, dont la dopamine dans la substance noire ; la dégénérescence des terminaisons dopaminergiques n'est ainsi pas liée à une neurodégénérescence de la substance noire [10].

Concernant les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire, une étude réalisée par Bizat et al., 2003 chez le rat Lewis mâle montre l'implication des calpaines, comme effecteurs majeurs de la mort cellulaire, observée uniquement dans le striatum, mais pas dans le cortex cérébral, peut-être en lien avec la régulation du Ca^{2+} [11]. Les effets neuropathologiques observés sont liés à une inhibition partielle de la SDH qui pourrait en effet suffire à réduire la capacité mitochondriale à réguler le Ca^{2+} cytosolique, notamment dans les neurones possédant le récepteur NMDA, permettant suite à son activation le passage dans le cytoplasme du Na^{+} et Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire. Kim et al., 2005 proposent aussi chez le rat mâle Sprague-Dawley mâle, qu'indépendamment d'une modification de l'inhibition de l'activité SDH, le maintien de l'homéostasie calcique expliquerait l'effet protecteur des ginsénosides ; alors que l'activité SDH n'est pas restaurée, la protection se manifeste par une réduction de la mortalité et des lésions striatales et par une amélioration des performances motrices [12].

Au niveau du striatum, la dopamine modulerait l'excitotoxicité neuronale, processus pathologique par hyperactivation des neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate qui activent des récepteurs comme les récepteurs NMDA et AMPA, provoquant une entrée massive dans la cellule d'ions calcium. Les dommages striataux associés au 3-NP ont ainsi été étudiés par Fernagut et al., 2002 chez la souris constitutivement hyperdopaminergique, du fait d'une invalidation génétique pour le transporteur de la dopamine (DAT), qui montre une réduction significative du nombre de neurones dopaminergiques dans la substance noire, ainsi qu'une activation gliale significativement plus importante [13]. Ces résultats pourraient être cliniquement pertinents chez l'homme car il existe des situations d'augmentation de la dopamine dans le striatum par exemple chez des consommateurs de cocaïne et de méthamphétamines, qui pourraient se trouver ainsi plus susceptibles aux inhibiteurs de SDH.

Colle et al., 2013 montrent chez le rat mâle Wistar exposé au 3-NP qu'un traitement préalable au probucol, substance hypolipidémiant à propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes, limite la diminution d'activité motrice spontanée et des performances motrices. Cependant ce traitement ne réduit pas l'inhibition du complexe II mais limiterait le stress oxydant striatal (peroxydation lipidique, activités SOD et catalase, iNOS) secondaire à la dysfonction mitochondriale [14]. Une autre étude par Orozco-Ibarra et al., 2018 montre l'effet protecteur de l'huile de foie de poissons, malgré une absence d'effet sur le complexe II, limitant les déficits de comportement exploratoire en s'accompagnant d'une activité accrue des complexes III et IV [15].

La neurotoxicité du 3-NP peut être exacerbée par co-exposition à d'autres substances neurotoxiques. Par exemple les neuroleptiques affectent la fonction mitochondriale et augmentent le relargage du glutamate au niveau de striatum, entraînant la mort de ces neurones par excitotoxicité. Ainsi Andreassen et al., 1998 montrent qu'une exposition chronique à un neuroleptique - l'halopéridol - contribue à des symptômes de dyskinésie orale, exacerbée et plus précoce lors d'association [16]. Une vulnérabilité accrue pourrait aussi être associée à des facteurs d'hôte, comme cela est suggéré par une toxicité accrue pour des

neurones striataux de souris en culture cellulaire, s'ils expriment une forme mutée de la protéine huntingtine telle que présente chez des patients atteints de maladie de Huntington (Ruan et al., 2004)[17].

Le malonate, inhibiteur réversible de la SDH, administré chez le rat induit également une dégénérescence nigro-striée. Connop et al., 1996 montrent chez le rat mâle (SpragueDawley) après infusion unilatérale dans la substance noire, une diminution ipsi-latérale dose-dépendante de l'activité tyrosine hydroxylase dans le striatum, réduite par un antagoniste (MK801) du récepteur NMDA [18]. D'après des travaux précédents, l'infusion intranigrale d'agonistes du récepteur NMDA entraîne une déplétion striatale en tyrosine hydroxylase, corrélée à celle observée dans la substance noire. Une étude par Ferger et al., 1999 chez le rat Wistar mâle montre que les lésions striatales observées après injection de malonate dans la substance noire sont réduites de façon équivalente après administration intranigrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ou systémique de MK-801 : la 6-OHDA (mais pas le MK-801) bloque l'augmentation importante de dopamine extracellulaire observée suite à l'injection de malonate et la production de radicaux libres associée au catabolisme de la dopamine [19]. Alors que, comme pour le 3-NP, la déplétion en dopamine limite les lésions striatales, Maragos et al., 2004 montrent chez la souris que le prétraitement de rats par un inhibiteur (ou sa déplétion d'origine génétique) de l'activité monoamine oxydase impliquée dans le catabolisme de la dopamine, réduit des lésions induites par le malonate, ce qui impliquerait une réduction de la production de ROS lors de l'oxydation de la dopamine [20].

Après injection intra-striatale chez le rat mâle Wistar, l'étude de Fleck et al., 2014 montre également que le malonate présente un potentiel convulsivant, déjà observé précédemment avec le 3-NP [17]. Toutefois l'absence de convulsions à des doses plus faibles de malonate, ainsi que l'absence d'éléments concernant les mécanismes neuronaux impliqués, rendent difficile l'interprétation de ces données et de leurs relations éventuelles avec l'inhibition de l'activité SDH.

Beal et al., 1994 montrent que chez le rat ayant reçu une injection intra-striatale de malonate, les lésions sont réduites de façon dose-dépendante par le coenzyme Q, qui protège de la déplétion en ATP induite par le malonate [21].

Greene et al., 1993 montrent chez le rat Sprague-Dawley la possibilité de limiter l'atteinte neuronale, par l'inhibiteur du NMDA MK-801, montrant que son mode d'action est indirectement lié à l'excitotoxicité par suractivation du récepteur NDMA liée au métabolisme énergétique neuronal perturbé [22]. Il est à noter que la co-administration de malonate et de succinate réduit les lésions striatales, indiquant l'association spécifique avec l'inhibition de SDH. Greene et al., 1995 montrent que les traitements par NMDA, AMPA ou glutamate seuls ne produisent que peu d'effets sur le striatum, mais que de larges lésions sont observées en combinaison avec le malonate à dose sub-toxique [23].

Un autre inhibiteur plus rarement examiné, le TTFA (2-thenoyltrifluoacétone), qui se lie au site de réduction de la quinone et empêche l'ubiquinone de s'y fixer, a montré récemment chez la souris une capacité à induire une atteinte du système nerveux dopaminergique (Ahn et al., 2021)[24]. Le TTFA a été choisi, avec l'atovaquone (ATO) inhibitrice du complexe III, pour des travaux *in vivo* chez la souris, à l'issue de travaux *in vitro* ciblant des mécanismes impliqués dans la maladie de Parkinson (incluant notamment la production de ROS) parmi 16 substances examinées affectant les complexes mitochondriaux I à V. Le potentiel neurotoxique *in vitro* du TTFA apparaît clairement inférieur à celui de la roténone, mais comparable, voire supérieur à celui du 3-NP. L'exposition par voie orale de souris à ces deux substances (TTFA et ATO) pendant 3 mois induit des déficits comportementaux ou/et moteurs

(p.ex. test Rotarod et construction de nids) et une neurodégénérescence dopaminergique significative au niveau du système nigro-strié cérébral et du système nerveux entérique. Ceci s'accompagne de signes d'agrégation de la protéine alpha-synucléine sous forme phosphorylée en sérine 129 et d'une réponse par des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6), également au niveau cérébral et intestinal.

L'ensemble des données concernant le 3-NP et le malonate montrent globalement la vulnérabilité particulière du striatum et la symptomatologie motrice associée à son atteinte, qui paraît au moins partiellement liée à l'inhibition de l'activité SDH. La spécificité striatale de la neurotoxicité n'est cependant pas absolue, comme en témoignent par exemple pour le 3NP des données récentes montrant une atteinte corticale et hippocampique chez la souris C57Bl/6 exposée au 3-NP, associée à une pathologie de la protéine tau, protéine impliquée dans les tauopathies chez l'homme, et une réaction neuroinflammatoire microgliale (Lahiani-Cohen et al., 2020)[25]. Dans le contexte de recherches concernant l'étiologie possible de la sclérose latérale amyotrophique, des études en culture cellulaire ont également montré une toxicité du malonate pour des neurones moteurs médullaires ou corticaux de rat, impliquant des mécanismes excitotoxiques (Kanki et al., 2004 ; van Westerlaak et al., 2001)[26,27]. Parmi les maladies neurodégénératives humaines sporadiques ciblant particulièrement le système nigro-strié, figurent la maladie de Parkinson et les maladies apparentées (« synucléinopathies »). Il est à noter que d'autres travaux expérimentaux ont montré la résistance au 3-NP et au malonate, comme au MPTP, de souris invalidées génétiquement pour l'expression de l'alpha-synucléine, protéine majeure dans les lésions caractérisant ces maladies, sans que l'inhibition de la SDH soit modifiée (Klivenyi et al., 2006 ; Ubhi et al., 2010)[28,29]. Les données récentes obtenues avec le TTFA suggèrent un potentiel d'atteinte dopaminergique, par exposition orale répétée sub-chronique chez

1. He, F.; Zhang, S.; Qian, F.; Zhang, C. Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid). *Neurology* **1995**, *45*, 2178-2183, doi:10.1212/wnl.45.12.2178.
2. Brouillet, E.; Guyot, M.C.; Mittoux, V.; Altairac, S.; Conde, F.; Palfi, S.; Hantraye, P. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* **1998**, *70*, 794-805, doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70020794.x.
3. Fernagut, P.O.; Diguët, E.; Stefanova, N.; Biran, M.; Wenning, G.K.; Canioni, P.; Bioulac, B.; Tison, F. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult C57Bl/6 mice: behavioural and histopathological characterisation. *Neuroscience* **2002**, *114*, 1005-1017, doi:10.1016/s0306-4522(02)00205-1.
4. Dautry, C.; Conde, F.; Brouillet, E.; Mittoux, V.; Beal, M.F.; Bloch, G.; Hantraye, P. Serial 1H-NMR spectroscopy study of metabolic impairment in primates chronically treated with the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *Neurobiol Dis* **1999**, *6*, 259-268, doi:10.1006/nbdi.1999.0244.
5. Baumgart, B.R.; Gray, K.L.; Woicke, J.; Bunch, R.T.; Sanderson, T.P.; Van Vleet, T.R. MicroRNA as biomarkers of mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **2016**, *312*, 26-33, doi:10.1016/j.taap.2015.10.007.
6. Akopian, G.; Crawford, C.; Petzinger, G.; Jakowec, M.W.; Walsh, J.P. Brief mitochondrial inhibition causes lasting changes in motor behavior and corticostriatal synaptic physiology in the Fischer 344 rat. *Neuroscience* **2012**, *215*, 149-159, doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.060.
7. Crawford, C.A.; Akopian, G.; Ring, J.; Jakowec, M.W.; Petzinger, G.M.; Andersen, J.K.; Vittozzi-Wong, P.; Wang, K.; Farley, C.M.; Charntikov, S.; et al. Acute and long-term response of dopamine nigrostriatal synapses to a single, low-dose episode of 3-nitropropionic acid-mediated chemical hypoxia. *Synapse* **2011**, *65*, 339-350, doi:10.1002/syn.20852.

8. Saydoff, J.A.; Liu, L.S.; Garcia, R.A.; Hu, Z.; Li, D.; von Borstel, R.W. Oral uridine pro-drug PN401 decreases neurodegeneration, behavioral impairment, weight loss and mortality in the 3-nitropropionic acid mitochondrial toxin model of Huntington's disease. *Brain Res* **2003**, *994*, 44-54, doi:10.1016/j.brainres.2003.09.049.
9. Blum, D.; Gall, D.; Cuvelier, L.; Schiffmann, S.N. Topological analysis of striatal lesions induced by 3-nitropropionic acid in the Lewis rat. *Neuroreport* **2001**, *12*, 1769-1772, doi:10.1097/00001756-200106130-00050.
10. Blum, D.; Galas, M.C.; Cuvelier, L.; Schiffmann, S.N. Chronic intoxication with 3-nitropropionic acid in rats induces the loss of striatal dopamine terminals without affecting nigral cell viability. *Neurosci Lett* **2004**, *354*, 234-238, doi:10.1016/j.neulet.2003.10.034.
11. Bizat, N.; Hermel, J.M.; Boyer, F.; Jacquard, C.; Creminon, C.; Ouary, S.; Escartin, C.; Hantraye, P.; Kajewski, S.; Brouillet, E. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* **2003**, *23*, 5020-5030, doi:10.1523/JNEUROSCI.23-12-05020.2003.
12. Kim, J.H.; Kim, S.; Yoon, I.S.; Lee, J.H.; Jang, B.J.; Jeong, S.M.; Lee, J.H.; Lee, B.H.; Han, J.S.; Oh, S.; et al. Protective effects of ginseng saponins on 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration in rats. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 743-756, doi:10.1016/j.neuropharm.2004.12.013.
13. Fernagut, P.O.; Diguët, E.; Jaber, M.; Bioulac, B.; Tison, F. Dopamine transporter knock-out mice are hypersensitive to 3-nitropropionic acid-induced striatal damage. *Eur J Neurosci* **2002**, *15*, 2053-2056, doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02047.x.
14. Colle, D.; Santos, D.B.; Moreira, E.L.; Hartwig, J.M.; dos Santos, A.A.; Zimmermann, L.T.; Hort, M.A.; Farina, M. Probulcol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. *PLoS One* **2013**, *8*, e67658, doi:10.1371/journal.pone.0067658.
15. Orozco-Ibarra, M.; Garcia-Morales, J.; Calvo-Silva, F.J.; Fernandez-Valverde, F.; Serrano-Garcia, N. Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr Neurosci* **2018**, *21*, 132-142, doi:10.1080/1028415X.2016.1237074.
16. Andreassen, O.A.; Ferrante, R.J.; Beal, M.F.; Jorgensen, H.A. Oral Dyskinesias and striatal lesions in rats after long-term co-treatment with haloperidol and 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* **1998**, *87*, 639-648, doi:10.1016/s0306-4522(98)00160-2.
17. Ruan, Q.; Lesort, M.; MacDonald, M.E.; Johnson, G.V. Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum Mol Genet* **2004**, *13*, 669-681, doi:10.1093/hmg/ddh082.
18. Connop, B.P.; Boegman, R.J.; Beninger, R.J.; Jhamandas, K. Attenuation of malonate-induced degeneration of the nigrostriatal pathway by inhibitors of nitric oxide synthase. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 459-465, doi:10.1016/0028-3908(95)00194-8.
19. Ferger, B.; Eberhardt, O.; Teismann, P.; de Groote, C.; Schulz, J.B. Malonate-induced generation of reactive oxygen species in rat striatum depends on dopamine release but not on NMDA receptor activation. *J Neurochem* **1999**, *73*, 1329-1332, doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0731329.x.
20. Maragos, W.F.; Young, K.L.; Altman, C.S.; Pocernich, C.B.; Drake, J.; Butterfield, D.A.; Seif, I.; Holschneider, D.P.; Chen, K.; Shih, J.C. Striatal damage and oxidative stress induced by the mitochondrial toxin malonate are reduced in clorgyline-treated rats and MAO-A deficient mice. *Neurochem Res* **2004**, *29*, 741-746, doi:10.1023/b:nere.0000018845.82808.45.
21. Beal, M.F.; Henshaw, D.R.; Jenkins, B.G.; Rosen, B.R.; Schulz, J.B. Coenzyme Q10 and nicotinamide block striatal lesions produced by the mitochondrial toxin malonate. *Ann Neurol* **1994**, *36*, 882-888, doi:10.1002/ana.410360613.
22. Greene, J.G.; Porter, R.H.; Eller, R.V.; Greenamyre, J.T. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* **1993**, *61*, 1151-1154, doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03634.x.
23. Greene, J.G.; Greenamyre, J.T. Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* **1995**, *64*, 2332-2338, doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64052332.x.
24. Ahn, E.H.; Lei, K.; Kang, S.S.; Wang, Z.H.; Liu, X.; Hong, W.; Wang, Y.T.; Edgington-Mitchell, L.E.; Jin, L.; Ye, K. Mitochondrial dysfunction triggers the pathogenesis of Parkinson's disease in neuronal C/EBPbeta transgenic mice. *Mol Psychiatry* **2021**, *26*, 7838-7850, doi:10.1038/s41380-021-01284-x.
25. Lahiani-Cohen, I.; Touloumi, O.; Lagoudaki, R.; Grigoriadis, N.; Rosenmann, H. Exposure to 3-Nitropropionic Acid Mitochondrial Toxin Induces Tau Pathology in Tangle-Mouse Model and in Wild Type-Mice. *Front Cell Dev Biol* **2019**, *7*, 321, doi:10.3389/fcell.2019.00321.

-
26. Kanki, R.; Nakamizo, T.; Yamashita, H.; Kihara, T.; Sawada, H.; Uemura, K.; Kawamata, J.; Shibasaki, H.; Akaike, A.; Shimohama, S. Effects of mitochondrial dysfunction on glutamate receptor-mediated neurotoxicity in cultured rat spinal motor neurons. *Brain Res* **2004**, *1015*, 73-81, doi:10.1016/j.brainres.2004.04.044.
 27. Van Westerlaak, M.G.; Joosten, E.A.; Gribnau, A.A.; Cools, A.R.; Bar, P.R. Chronic mitochondrial inhibition induces glutamate-mediated corticomotoneuron death in an organotypic culture model. *Exp Neurol* **2001**, *167*, 393-400, doi:10.1006/exnr.2000.7570.
 28. Klivenyi, P.; Siwek, D.; Gardian, G.; Yang, L.; Starkov, A.; Cleren, C.; Ferrante, R.J.; Kowall, N.W.; Abeliovich, A.; Beal, M.F. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiol Dis* **2006**, *21*, 541-548, doi:10.1016/j.nbd.2005.08.018.
 29. Ubhi, K.; Rockenstein, E.; Mante, M.; Inglis, C.; Adame, A.; Patrick, C.; Masliah, E. Alpha-synuclein deficient mice are resistant to toxin-induced multiple system atrophy. *Neuroreport* **2010**, *21*, 457-462, doi:10.1097/WNR.0b013e328338ba6b.

Contribution personnelle : Pathologies rénales

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Laurence Huc

Co-signataire : Thomas Claudepierre

Les maladies rénales représentent un enjeu majeur de santé publique. En effet, dans le monde, on comptait, en 2017, 843,6 millions de personnes atteintes de maladies rénales chroniques (CKD Chronic Kidney Disease), auxquels s'ajoutent 13,3 millions de personnes atteintes par une maladie rénale aiguë (AKI Acute Kidney Disease) et 3,9 millions en traitement de substitution rénale. Cela correspond, par exemple, à 2 fois le nombre de personnes touchées par le diabète et 20 fois celles touchées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)(Jager et al. 2019). L'insuffisance rénale se caractérise par une baisse du débit de filtration glomérulaire, une accumulation des déchets azotés, des anomalies métaboliques (phosphocalciques, hyperkaliémie, toxines urémiques), une hyperhydratation, une anémie rénale (déficit ou baisse de réponse à l'EPO).

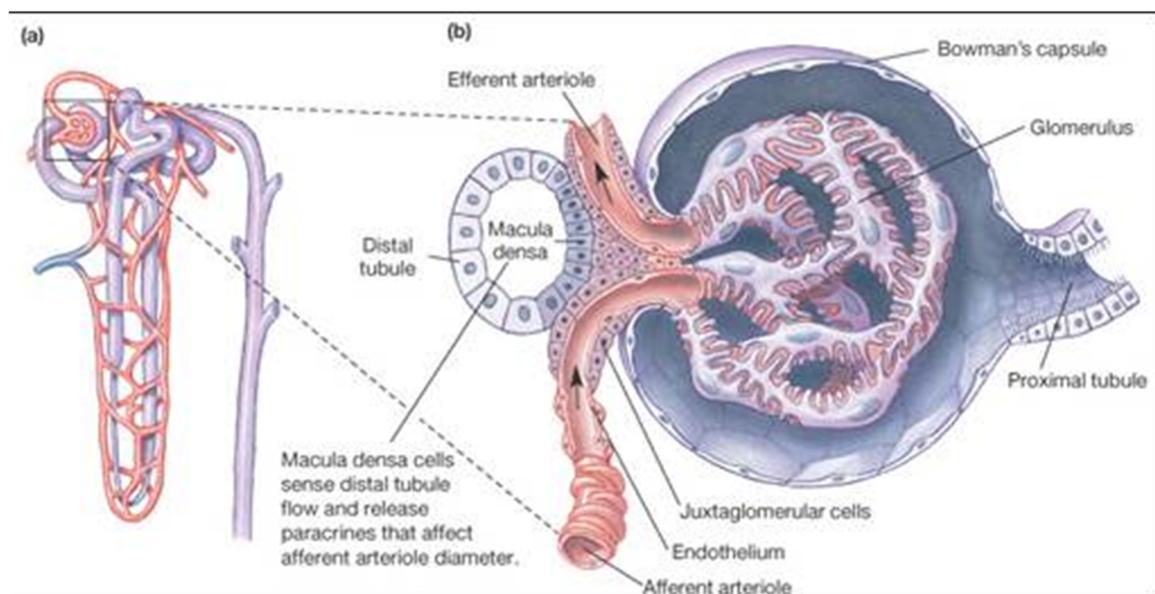


Figure présentant la macro et la microstructure du néphron

Le débit sanguin rénal est d'1L par minute. Le débit de filtration glomérulaire est de 100 à 130 mL/min, soit environ 180 L de sang filtré par jour. La fonction rénale repose sur 3 caractéristiques : 1) la filtration glomérulaire qui vise à épurer les déchets azotés, 2) les fonctions tubulaires pour l'équilibre hydrique et homéostatique et 3) une architecture impliquant une forte densité capillaire.

Les épisodes d'insuffisance rénale aiguë, comme l'ischémie reperfusion, s'accompagnent d'un risque multiplié par 9 de développer une maladie rénale chronique. Ceux-ci sont caractérisés par un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules tubulaires proximales (Nielsen et al. 2017).

La recherche des mécanismes impliqués dans la progression de la fibrose rénale a révélé que des atteintes du métabolisme énergétique, notamment l'oxydation des acides gras au niveau

des cellules épithéliales tubulaires, pouvaient être déterminantes dans le développement de la fibrose (Kang et al. 2015). Par ailleurs, l'exemple de la maladie mitochondriale rare MELAS (caractérisée comme une maladie neuro-métabolique d'origine génétique liée à un dysfonctionnement mitochondrial, entraînant une encéphalo-myopathie, une acidose lactique et des épisodes évoquant des accidents vasculaires cérébraux) conduit également à des atteintes glomérulaires (hyalinose, glomérulosclérose), une tubulopathie proximale et une FTI entraînant une insuffisance rénale chronique. Le cycle de Krebs semble également primordial dans les épisodes d'ischémie-reperfusion, dans lesquels l'activité fumarase baisse, associée à une baisse de la quantité tissulaire de mitochondries (Nielsen et al. 2017).

Les dysfonctionnements mitochondriaux ont été associés au développement de ces maladies rénales. De plus, la majorité des mutations de l'ADN mitochondrial conduirait des atteintes glomérulaires, associées à des maladies telles que la glomérulosclérose segmentaire et focale. Au niveau cellulaire, des perturbations seraient liées à la baisse de production d'ATP, des altérations de la signalisation calcique, une induction d'un stress oxydant et de l'apoptose.

Il est difficile de savoir si les altérations mitochondriales sont à l'origine du dysfonctionnement du podocyte ou si elles en sont les conséquences. Mais la phosphorylation oxydative est majeure dans la différenciation podocytaire.

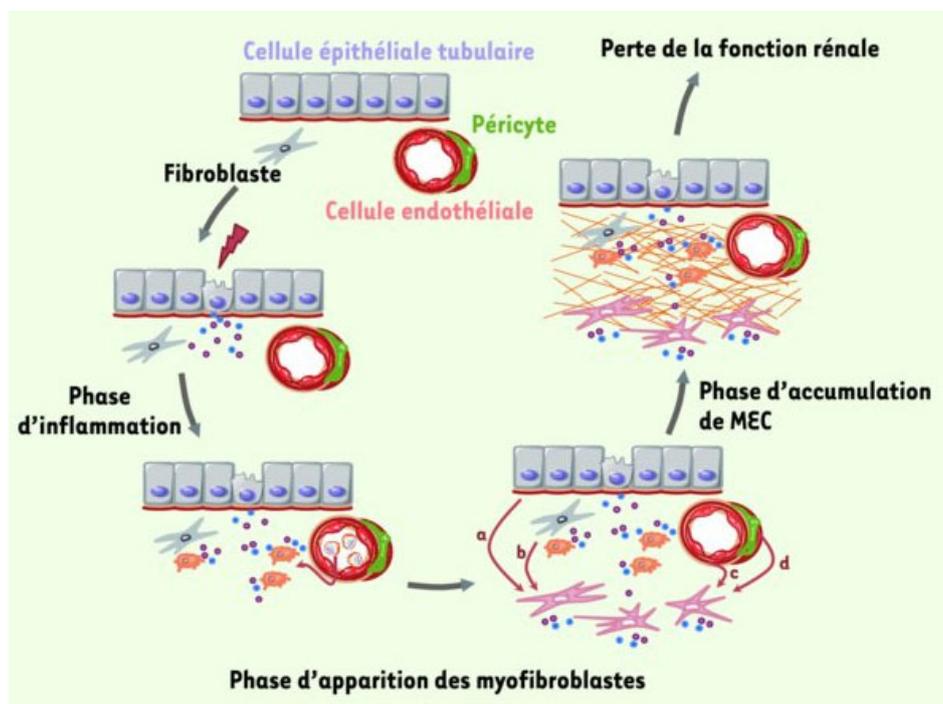


Figure présentant les trois étapes de la FTI

Phase inflammatoire : en réponse à un stress, les cellules rénales résidentes sont activées et produisent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Ceci induit le recrutement et l'infiltration de cellules inflammatoires qui produisent alors des radicaux libres oxygénés ou des cytokines pro-inflammatoires et profibrosantes. **Phase d'apparition des myofibroblastes** : le contexte inflammatoire mène à l'apparition des myofibroblastes par quatre voies principales : (a) à partir des cellules épithéliales tubulaires (TEM) ; (b) à partir des fibroblastes interstitiels ; (c) à partir des cellules endothéliales des capillaires (TEndM) et (d) à partir des péricytes. **Phase d'accumulation de MEC (matrice extracellulaire)** : les myofibroblastes sont les cellules à l'origine de l'accumulation de MEC car ils synthétisent en excès les protéines matricielles mais ils sécrètent également les inhibiteurs des protéases dégradant la MEC. La présence de la FTI signe alors l'évolution vers la perte de la fonction rénale (Klein et al. 2011))

Les différentes atteintes rénales connues sont :

- **insuffisance rénale aiguë** : baisse brutale du débit de filtration glomérulaire (fonctionnelle ou liée à une atteinte organique).
- **nécrose tubulaire aiguë**: aspect clarifié du cytoplasme des cellules tubulaires (*basophilie*), cellules nécrotiques / débris cellulaires (*cellular casts*).
- **résorption protéique du tube proximal** (*gouttelettes hyalines*): syndrome néphrotique,
- **fibrose rénale** : accumulation de matrice extra-cellulaire dans l'interstitium (fibrose interstitielle) ou les glomérules (glomérulosclérose). Il existe une corrélation entre la fibrose et la fonction rénale.
- **néphropathie glomérulaire chronique** : insuffisance rénale chronique (baisse du débit de filtration glomérulaire > 3 mois) avec fibrose interstitielle / glomérulaire.
- **pyélite** : inflammation des cavités pyélocalicielles.

Le rein est un organe pouvant être touché par la fibrose. En particulier, trois étiologies sont décrites : la fibrose vasculaire, la fibrose glomérulaire (ou glomérulosclérose) et la fibrose tubulo-interstitielle (FTI). La majorité des maladies rénales est liée à une glomérulosclérose, mais la progression aboutit ensuite à une FTI. Dans tous les cas, ce processus progressif est irréversible : les traitements visent à stabiliser la fonction rénale et à ralentir la progression. Dans les cas extrêmes, la greffe est l'ultime alternative thérapeutique.

La hyalinose segmentaire et focale (HSF ou *Focal segmentary glomerular hyalinosis (FSGH)*) est l'une des causes principales du syndrome néphrotique idiopathique et se caractérise par une néphropathie glomérulaire responsable d'une protéinurie sélective importante, sans lésion inflammatoire rénale, ni complexe immun circulant. La HSF est irréversible, cortico-résistante ou cortico-dépendante. Elle est caractérisée par un ensemble de lésions des glomérules (podocytes turgescents en couronne ou lésions de hyalinose scléreuse) et par la nature des altérations endocapillaire et extracapillaire. Ces lésions sont segmentaires (une partie du glomérule) et focales (certains glomérules). Par microscopie par fluorescence, on voit les dépôts d'IgM et de complément C3 au niveau des dépôts hyalins. En microscopie électronique, l'effacement des pieds des pédicelles est une des anomalies principales.

Les HSF secondaires peuvent être liées à des facteurs environnementaux, comme les virus, mais aussi les médicaments (anticalcineureines) et les toxiques (inhibiteurs de mTOR).

Les HSF primaires ou idiopathiques impliqueraient un facteur circulant et /ou une dérégulation lymphocytaire. Dans ce cas, ce serait une pathologie systémique, dont le pronostic est sévère du fait de l'évolution fréquente vers l'insuffisance rénale chronique. La nature du facteur circulant est encore incertaine, mais il semblerait que ce facteur soit capable de fixer des immunoglobulines ou s'associer au galactose. Sous cette forme, ce facteur serait toxique pour les podocytes, en ciblant le cytosquelette. Ceci modifie les communications inter et intra-cellulaires des podocytes.

Les podocytes sont des cellules épithéliales viscérales qui maintiennent la fonction de barrière de filtration du glomérule. Ces cellules sont très dynamiques et ont une forte demande énergétique pour maintenir l'organisation du cytosquelette, des protéines de la matrice extracellulaire, la mobilité et le remodelage des pieds au niveau du glomérule. Ces cellules différenciées ont une faible capacité de régénération et sont très sensibles aux stress. Les altérations des podocytes conduisent au développement de l'albuminurie et la progression éventuelle vers des maladies glomérulaires comme la glomérulosclérose segmentaire et focale.

Bibliographie :

- Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. 2019. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int* 96:1048–1050; doi:10.1016/j.kint.2019.07.012.
- Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko Y-A, Han SH, Chinga F, et al. 2015. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 21:37–46; doi:10.1038/nm.3762.
- Klein J, Miravete M, Buffin-Meyer B, Schanstra JP, Bascands J-L. 2011. La fibrose tubulo-interstitielle rénale - Menace fantôme ou dernière croisade ? *médecine/sciences* 27:55–61; doi:10.1051/medsci/201127155.
- Nielsen PM, Eldirdiri A, Bertelsen LB, Jørgensen HS, Ardenkjaer-Larsen JH, Laustsen C. 2017. Fumarase activity: an in vivo and in vitro biomarker for acute kidney injury. *Sci Rep* 7:40812; doi:10.1038/srep40812.

Contribution personnelle : Perturbations endocriniennes

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Laurence Huc

Co-signataires : Sylvie Bortoli, Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

Cette partie a été établie à partir d'une recherche méthodologique par mots-clés dans tous les dossiers réglementaires disponibles pour chaque SDHI, avec parfois, l'analyse des études d'origine (classées confidentielles). Cette partie est issue d'un travail collectif, et a été déplacée en contribution personnelle, suite à l'avis des CES.

Le choix a été fait de copier-coller la version qui avait été approuvée collégalement par le GT en novembre 2022 et de remplacer « le GT » par « nous ».

Ce chapitre vise à documenter les propriétés de perturbateurs endocriniens potentiels des différents SDHI. Elle traite en particulier des effets des substances indépendamment de leur activité inhibitrice de la SDH. Les effets reprotoxiques et thyroïdiens sont également traités dans les parties dédiées, qui sont restées positionnés dans le corps du rapport.

Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait, induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations. Dans la réglementation sur les substances phytopharmaceutiques (CE n°1107/2009), l'évaluation de la perturbation endocrinienne doit se conformer à la méthodologie du guide de EFSA/ECHA (2018). Tous les dossiers revus par le GT sont antérieurs à la mise en application de ce document guide (Novembre 2018). Les références de ces dossiers sont visibles dans le rapport principal.

Benzovindiflupyr : Des tests de la perturbation endocrinienne concernant la modalité thyroïde ont été conduits. Aucun effet sur la TPO n'a été rapporté, alors que les rats mâles exposés pendant 2 ans présentent des adénomes thyroïdiens folliculaires (cf toxicité d'organes thyroïde et avis divergent associé).

L'EFSA considère que la perturbation endocrinienne ne peut pas être exclue sur la base des effets observés dans l'étude sur 2 générations (altération des paramètres spermatiques, diminution du nombre de follicules et corps jaunes, augmentation du dioestrus lactationnel, retard de maturation sexuelle et hypertrophie du cortex surrénalien et de l'hypophyse). L'EFSA recommande la réalisation de tests pour répondre à cette interrogation.

Boscalid : Les conclusions du dossier réglementaire indiquent que le boscalid n'entraînerait pas de perturbation endocrinienne. Les effets sur la thyroïde (augmentation des hyperplasies des cellules C, tant chez les mâles que les femelles rat exposés) sont jugés non pertinents pour l'humain par l'état-membre rapporteur. Nous remettons en cause cette non-pertinence (cf toxicité d'organes thyroïde).

Des publications concernant le potentiel PE ont été présentées dans le dossier réglementaires et sont présentées ci-après. Une publication (Reif et al. 2010) fait référence à des prédictions sur ToxCast screening indiquant qu'il n'aurait pas d'effet sur les récepteurs aux androgènes et aux oestrogènes (AR et ER), en accord avec les données *in vivo*. Cependant, bien que les effets thyroïdiens soient observés *in vivo*, l'analyse du score ToxPi (Toxicological Priority Index) indique que la liaison du boscalid sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) est peu probable.

Le boscalid a été testé dans le cadre d'une étude *in vitro* sur HepG2 exprimant des gènes-rapporteurs sous la dépendance de récepteurs nucléaires (Shah et al, 2011). Le boscalid

induirait des réponses positives pour PPARgamma, PXR et comme induction des gènes-cibles, il y aurait le CYP1A1, le CYP1A2, le CYP2B6 et le CYP3A4. Aucun effet n'est noté pour AR et ER.

De même, dans un test de l'EPA Toxcast sur des modèles primaires d'hépatocytes humains, le boscalid induit des gènes CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, UGT1A1, SULT2A1, GSTA2, ABCB1, ce qui pourrait induire AhR, CAR et PXR (Rotroff DM 2010a). Ainsi, le boscalid serait capable de perturber la signalisation cellulaire et d'affecter l'expression des enzymes de détoxification. Cela pourrait avoir des conséquences sur la bioactivation d'autres polluants se retrouvant en mélange avec le boscalid, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques, cibles chimiques de la voie du AhR.

Cyflumetofen :

L'analyse des dossiers réglementaires du cyflumetofen a mis en évidence un faisceau d'éléments forts évoquant la perturbation endocrinienne. Les rapporteurs et rapportrices de ce dossier ont émis une alerte forte sur la nécessité à ce qu'il entre dès que possible dans une ré-évaluation de son potentiel PE.

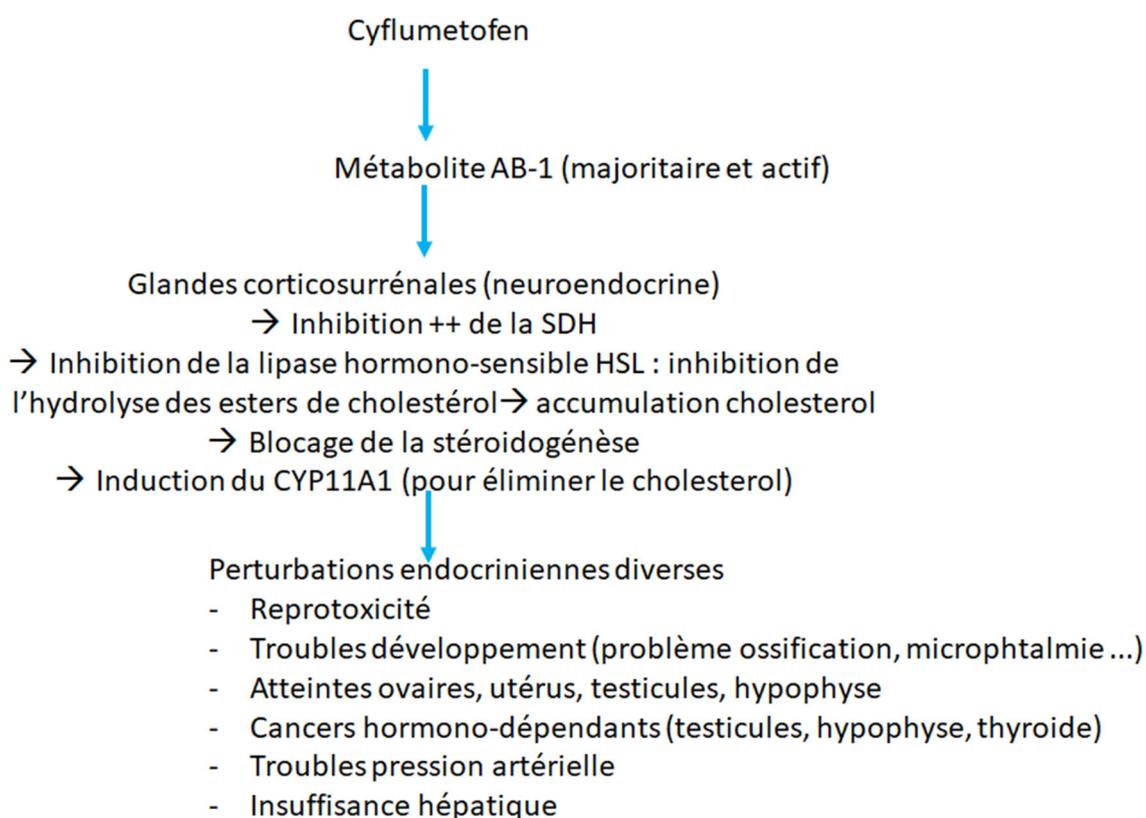
Les études toxicologiques chez le rat, la souris, le chien et le lapin révèlent des atteintes des cortico-surrénales dans toutes les conditions (14 études courtes et long terme au total). Les rapporteur/rices ont questionné si ces atteintes étaient liées à une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales. Cette affection rare est due à une perte d'activité variable de certaines enzymes. Ce déficit entraîne une production anormale des hormones par les glandes surrénales (le cortisol et l'aldostérone sont souvent diminués, les androgènes sont souvent augmentés). Par ailleurs, les déséquilibres hormonaux sont souvent associés à une hypertension artérielle. Malheureusement, les études disponibles dans le dossier réglementaire ne comportent pas de dosage hormonal, ni de suivi de la pression artérielle, hormis une étude parcellaire chez le chien. Pourtant, la littérature scientifique (Lenders et al. 2020) a décrit les effets du blocage de la SDH sur le système corticosurrénalien et cela n'a pas été pris en compte pour éclairer l'interprétation des données dans le cadre de l'expertise du dossier réglementaire.

Une étude chez le rat montre que le cyflumetofen diminue l'expression génique de la lipase hormonosensible (HSL) dans les surrénales. La LHS est une enzyme majeure impliquée dans le métabolisme du cholestérol car elle régule l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre précurseur de la stéroïdogénèse. Ainsi, l'inhibition de la LHS entraîne une diminution de synthèse de corticostérone sur des cellules surrénales primaires de souris (Kraemer et al. 2004). Même si l'expression génique de la LHS n'informe que partiellement sur l'activité de l'enzyme, les auteurs proposent que la diminution de son expression entraîne une inhibition de l'hydrolyse des esters de cholestérol, conduisant à un dépôt de cholestérol dans les surrénales. Ceci est en cohérence avec l'augmentation des concentrations en cholestérol total, cholestérol libre et cholestérol estérifié dans les surrénales (confirmé par Kraemer et al. avec les souris LHS-/- (Kraemer et al. 2004)) mais aussi avec l'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques observées dans les cellules corticales des surrénales. Les auteurs ont également observé une augmentation de l'expression génique de CYP11A1 dans les surrénales, qu'ils ont considérée comme une réponse secondaire à l'élimination du cholestérol déposé puisque CYP11A1 est une enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol qui convertit le cholestérol en prégnénolone.

Compte tenu des résultats obtenus dans l'étude transgénérationnelle chez le rat, on peut se questionner sur l'impact du cyflumetofen sur les hormones sexuelles, la maturation sexuelle et la reproduction. Cette étude montre que le cyflumetofen induit un retard de maturation sexuelle dans les deux sexes de la génération F1 ainsi qu'une diminution des concentrations circulantes en FSH, progestérone et 17beta-oestradiol associée à un allongement du cycle œstral chez les femelles F1.

Les observations réalisées sur des modèles *in vitro* renforcent les questionnements quant aux effets perturbateurs endocriniens du cyflumetofen. Ces données montrent que le cyflumetofen n'a pas d'activité mimant l'action des oestrogènes. Par ailleurs, les données complémentaires présentées la proposition de classification suggèrent que le cyflumetofen n'a pas non plus d'activité mimant l'action des androgènes. En revanche, le cyflumetofen a une influence sur la voie de la stéroïdogénèse dans les cellules surrénales, agissant comme un inhibiteur de la production de testostérone. Ceci pourrait relever d'une perturbation endocrinienne.

Nous constatons que 14 études réglementaires et de la littérature scientifique montrent que le cyflumetofen altère l'équilibre des hormones sexuelles, la maturation sexuelle et la capacité de reproduction par des mécanismes possiblement communs aux surrénales, aux ovaires et aux testicules. Ceci a été identifié sur 4 espèces animales et *in vitro* sur des tests OCDE. Nous recommandons que l'effet PE du cyflumetofen soit revu de façon prioritaire en lien avec les critères PE issus du document guide réglementaire 2018.



Proposition de mode d'action du cyflumetofen chez les mammifères (hypothèse formulée à partir des données disponibles dans le dossier réglementaire)

Zone floue entre la perturbation endocrinienne et la cancérogénicité du cyflumetofen

Le cyflumetofen est classé cancérogène de catégorie 2 selon le règlement CLP. Outre les effets observés sur les corticosurrénales dans toutes les expérimentations animales (rat, souris, lapin, chien) aiguës, chroniques et développementales, dont certains pourraient être des phéochromocytomes non caractérisés, des tumeurs ont été observées dans l'étude conduite sur 2 ans chez le rat : des adénomes de cellules de Leydig, des carcinomes thyroïdiens des cellules C et des adénomes hypophysaires antérieurs. Pourtant, il est noté dans l'addendum du dossier réglementaire (p276) qu'il n'y a pas d'effets cancérogènes sur les

organes reproducteurs, pour exclure les effets de la PE par le cyflumetofen. Ces conclusions ne semblent pas être en accord avec l'existence des tumeurs rapportées ci-dessus. De plus, il apparaît contradictoire de considérer que le cyflumetofen n'est pas un perturbateur endocrinien sous prétexte qu'il n'y a pas de tumeurs d'organes reproducteurs, quand des tumeurs au niveau des testicules sont observées.

Les rapporteur/trices se sont intéressées plus avant aux arguments du pétitionnaire pour rejeter la classification du cyflumetofen comme cancérogène. En effet, les adénomes des cellules de Leydig (LCA) sont statistiquement significatifs aux fortes doses, même par rapport aux contrôles historiques. Il semblerait que les perturbations endocriniennes observées chez les animaux recevant du cyflumetofen soient impliquées dans les LCA. Elles sont même proposées comme mode d'action (MOA) pour classer ces tumeurs comme non pertinentes pour l'humain (rapport JMPR 2014). Plus précisément, les rapporteurs considèrent que les effets cancérogènes ne sont pas liés directement à la molécule mais à son effet perturbateur endocrinien. Les arguments avancés ont été que les LCA seraient causés par les perturbations du système hormonal oestrogène/androgène.

Pour examiner cette hypothèse, différents tests ont été conduits *in vitro* selon le document guide 2018 :

- Test d'inhibition de l'aromatase d'après la ligne directrice de l'US-EPA, OPPT 890.1200 (2009) : Négatif
- Test d'activité transcriptionnelle du récepteur aux oestrogènes (ER), d'après la ligne directrice de l'USEPA, OPPT 890.1300 : Négatif
- Test de liaison de l'ER d'après la ligne directrice de l'USEPA, OPPT 890 1250 : Négatif
- Test de liaison du récepteur aux androgènes (AR) d'après la ligne directrice de l'USEPA, OPPT 890 1150 : Effet 16,4 13,4 % à la forte dose 10^{-4} . Effet jugé marginal
- Test de stéroïdogénèse, avec les cellules adrénocorticales H295R, qui métabolisent le cholestérol en œstradiol E2 et testostérone, d'après la ligne directrice de l'USEPA, OPPT 890 1550.
 - Cytotoxicité à 10 μ M après 48h d'exposition : 61 % viabilité.
 - Augmentation synthèse E2 de 1,5 fois à 10 μ M et de 1,64 fois à 5 μ M
 - Baisse synthèse de testostérone : 0,63 à 0,75 fois pour 1, 5 et 10 μ M respectivement.

Conclusion : le cyflumetofen diminue la stéroïdogénèse

Le pétitionnaire conclut donc que le MOA lié aux LCA serait la baisse de la testostérone, en bloquant la stéroïdogénèse ou en augmentant l'excrétion biliaire de la testostérone par induction hépatique (sans investigation permettant de valider cette hypothèse).

Ceci entraînerait une compensation transitoire par une augmentation rétroactive de la production de LH, provoquant la prolifération des cellules de Leydig, et ainsi, la formation de LCA.

Les rats Fisher seraient prédisposés à ces tumeurs. Cette souche serait plus sensible aux variations de LH que les humains. Comme ces tumeurs sont observées à forte dose de cyflumetofen, que l'humain est moins sensible et qu'il n'y avait pas de lésions préneoplasiques après une exposition courte et chez d'autres espèces animales, les pétitionnaires ont estimé que les doses actuelles autorisées étaient suffisamment protectrices.

On note qu'il n'y a pas eu de dosage de LH pour appuyer cette hypothèse. De plus, il est important de noter que le JMPR (2014) conclut que le cyflumetofen était cancérogène chez le rat mâles mais non cancérogène chez le rat femelle ou la souris.

« Le pétitionnaire avance l'argument que les rats Fisher seraient prédisposés à ces tumeurs »
Si cela est confirmé, il est regrettable que cette souche de rats ait été sélectionnée pour

effectuer des tests dont il était prévisible que les résultats seraient difficilement transposables à l'humain.

L'ECHA a cependant jugé ces arguments non recevables et, en conséquence, a classé la substance cancérigène de catégorie 2.

Ainsi, concernant les discussions sur la potentielle identification du cyflumetofen comme cancérigène, il est noté que l'argument de la perturbation endocrinienne est utilisé comme MOA pour ne pas le classer comme cancérigène chez l'humain. Le requérant identifie de fait le cyflumetofen comme PE mais réfute en même temps la classification en PE sur la base d'arguments hautement spécieux.

Compte tenu des éléments sur la perturbation endocrinienne précédemment présentés au sein de différentes expériences conduites sur différents organismes et afin d'être en cohérence avec les différents rapports établis (EFSA, ECHA, JMPR), nous recommandons à ce que le cyflumetofen soit classé comme perturbateur endocrinien.

Fluopyram : Des effets sur la thyroïde ont observés et détaillés dans la section dédiée. Aucun test étudiant spécifiquement la perturbation endocrinienne n'est disponible.

Flutolanil : Les études investiguant la perturbation endocrinienne ont été conduites et rapportées dans le DAR (2006), avec en plus, les études conduites par USEPA (2015) et des études *in vitro* Toxcast (2016). Les tests conduits *in vitro* aboutissent à des résultats négatifs : absence d'activité transcriptionnelle de ERalpha, absence d'effet utéro-trophique sur des rates ovariectomisées, absence d'effet sur l'activité de stéroïdogénèse, absence d'effet androgénique et anti-androgénique (test de Hershberger), et absence d'activité inhibitrice de l'aromatase. Un test est équivoque pour l'activité de liaison à l'AR, par un test de transactivation. Etant donné que le test de Hershberger *-in vivo-* est négatif, les conclusions du dossier sont que le flutolanil ne présente pas d'activité de liaison à AR. Le flutolanil a également été testé négatif sur un essai de puberté chez les rats mâles et femelles. Aucun effet n'a été observé sur la thyroïde, la réponse androgénique et la réponse oestrogénique. En revanche, une étude publiée dans la littérature (Oh et al. 2007) révèle une activité oestrogénique du flutolanil sur les lignées MCF7 et MDA-MB 231. Cependant, les effets sont observés à des doses trop élevées après revue de l'article par les rapporteur/trices. Une autre étude publiée (Kojima et al. 2004), montre que le flutolanil n'est pas agoniste ni antagoniste de ER ni de AR aux concentrations testées (inférieures à 10⁻⁵M). Malgré qu'elle ne suive pas les bonnes pratiques de laboratoire ni les lignes directrices de l'OCDE, cette étude est considérée fiable par les rapporteur/trices.

Fluxapyroxad : Il est rapporté des tumeurs thyroïdiennes. Des analyses ont été réalisées afin de voir comment cette substance affecterait la signalisation cellulaire (voir section dédiée). Aucun test étudiant spécifiquement la perturbation endocrinienne n'est disponible.

Isofétamid : sur la base de sa structure chimique (ne réagissant pas avec AR et ER), en absence d'effet cancérigène, sur la fertilité ou de troubles développementaux, la nécessité d'évaluer l'effet PE n'a pas été jugée pertinente par l'Etat-membre rapporteur. Cependant, les effets sur la thyroïde auraient exigé de conduire des études sur la perturbation thyroïdienne. Les effets développementaux sont pourtant notés (hémorragies cérébrales, déviation de l'artère ombilicale, ossification incomplète chez le rat) ainsi que sur la reproduction (retard de l'ouverture vaginale à la dose forte pour les F1).

Isopyrazam : Ce SDHI est classé reprotoxique de catégorie 1B pour le développement (voir partie reprotoxicité). Aucun test étudiant spécifiquement la perturbation endocrinienne n'est disponible.

Penflufen : Lors de l'étude de cancérogénicité chez le rat sur 2 ans, une plus forte incidence d'adénomes tubulostromales ovariens est rapportée à la dose de 7000 ppm, soit 288 et 399 mg/kg pc/j chez les mâles et les femelles respectivement (7 animaux sur 60 contre 2/60 pour les témoins). Ainsi, dans ce dossier, la perturbation endocrinienne est abordée au regard de

la justification de la (non)-cancérogénicité du penflufen. Cet effet cancérogène n'a pas été retenu comme lié au traitement dans le dossier pour plusieurs raisons.

- 1) Ces tumeurs seraient liées à des dérégulations hormonales. Il est rapporté, sans expérimentation complémentaire, que l'effet direct du penflufen sur les ovaires sans changement hormonal est peu probable.
- 2) Il est de plus estimé que si le penflufen avait une réelle activité de perturbation hormonale, il y aurait une incidence plus marquée de ces tumeurs.
- 3) Le penflufen n'a pas d'effet sur le poids des ovaires, ni sur le développement des follicules, phénomènes directement sous contrôle hormonal.
- 4) Il n'y aurait pas non plus d'épithélium hyperplasique identifié après exposition au penflufen. Or, d'après la base de données des contrôles historiques RITA selon Dixon et al (2014), les adénomes ovariens seraient des extensions/progressions des hyperplasies.
- 5) Pas d'effet lié à la perturbation endocrinienne identifié dans les études de toxicité sub-chronique chez le rat et la souris, ainsi que dans les études sur le développement chez le rat et le lapin.
- 6) Enfin, ces tumeurs seraient spécifiques des rongeurs et non pertinentes pour l'humain.

Compte tenu de la particularité de tumeurs ovariennes à être dépendantes des régulations hormonales, il aurait été pertinent de mener des études spécifiques de la perturbation endocrinienne de niveau 2 (ECHA 2018).

Pydiflumetofen : Les tests spécifiques de la PE n'ont pas été jugés nécessaires sur la base des critères de WHO/IPCS 2002³⁷. Cependant, nous estimons que l'on ne peut pas exclure les effets sur la thyroïde et qu'il y a donc un manque de connaissances dans le dossier d'évaluation. Cette conclusion a été réalisée avant la mise en application du guide PE dans la réglementation phytopharmaceutique.

Les effets thyroïdiens sont observés dans les études chez le rat sur 13 semaines et de reproduction sur 2 générations. Le pydiflumetofen n'aurait pas d'effet sur l'activité de la thyroid peroxidase.

La maturation sexuelle serait retardée pour les mâles de la génération F1 à 4500 ppm (soit 363,8 mg/kg pc/j) et les femelles de la génération F1 à 1500 ppm (soit 140,6 mg/kg pc/j). Les effets chez les mâles seraient imputables à la toxicité systémique, chez les femelles la toxicité systémique est faible à la dose associée au retard de maturation sexuelle. Cependant, dans ce cas, la PE est exclue aussi, sans réelle justification dans le dossier. Cette valeur est cependant prise en compte pour la NOAEL issue de l'étude chez le rat sur 2 générations. A elle-seule, elle ne permet pas de conclure sur l'effet PE du pydiflumetofen mais aucune étude n'a été demandée pour aller plus loin dans les recherches.

Sedaxane : Lors de la discussion communautaire sur les effets PE du sedaxane, une évaluation selon le poids de la preuve a été réalisée sur les effets de l'exposition *in utero* à cette substance sur la distance anogénitale (DAG). Chez les rongeurs, la DAG serait sous contrôle androgénique, avec une augmentation de la DAG quand les androgènes, comme la testostérone, augmentent. Or, les androgènes devraient aussi « viriliser » les femelles, avec la réduction du nombre de mamelles et des anomalies vaginales et utérines. Ici, le sedaxane ne montre pas ces effets selon l'Etat-membre rapporteur. De plus, la performance reproductive ne semble pas affectée ; il n'y a pas de retard de cycles chez les F2 ; le temps pré-coïtal avant l'accouplement est inchangé et enfin, en histologie, rien ne laisse présager des perturbations endocriniennes. Ainsi, l'Etat-membre rapporteur indique que l'augmentation de la DAG chez les femelles F2 serait équivoque et n'indiquerait pas un effet délétère lié à la perturbation

³⁷ An endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations.

endocrinienne. Cependant, comme indiqué plus haut, des anomalies vaginales ont été effectivement observées mais cette mention a été supprimée du dossier lors de ses mises à jour. Compte-tenu de l'ensemble des éléments, cette suppression d'information pouvant révéler des effets de perturbation de la voie des AR est abusive.

De plus, il est également important de noter que l'étude de cancérogénicité sur 2 ans révèle que les rates présentent une sur-incidence de tumeurs dans les organes reproducteurs des femelles, à savoir des adénocarcinomes utérins. Les effets tumoraux thyroïdiens et hépatiques sont également rapportés. Une atrophie testiculaire est observée chez le chien tandis que, chez la lapine, on note une baisse du poids des petits dans une étude de toxicité développementale.

Ainsi, face à ces effets observés dans différentes études, différentes espèces, avec des tumeurs évoquant la PE (ovaires, thyroïde), afin d'écartier tout effet PE, il aurait été pertinent de conduire des tests supplémentaires sur la perturbation endocrinienne.

En résumé, les dossiers réglementaires du benzovindiflupyr, du boscalid, du cyflumetofen, du flutolanil, de l'isofetamid, du pydiflumetofen et du sedaxane indiquent des mécanismes potentiels de perturbation endocrinienne. Ceux-ci pourraient être indépendants de l'inhibition de la SDH. Nous notons que les tests de la réglementation EFSA 2018 ne sont pas systématiquement requis (dossiers antérieurs à la date d'application) et ne permettent pas d'investiguer suffisamment les potentielles perturbations endocriniennes engendrées par l'exposition aux SDHI. Pour d'autres, malgré les tests, les conclusions n'ont pas abouti à considérer le SDHI comme un PE, comme cela est le cas pour le cyflumetofen. Ainsi, nous considérons que les effets doivent être pris en compte et revues pour conclure sur PE du cyflumetofen. Une évaluation rigoureuse de la perturbation endocrinienne a minima en accord avec la réglementation devrait permettre une meilleure prise en compte de ces effets délétères. Nous notons également que les maladies humaines liées à l'inhibition partielle de la SDH génétiquement touchent le système neuroendocrinien. Ainsi, les atteintes observées de ce système par les SDHI pourraient être également liées à l'inhibition de la SDH (voir partie corticosurrénales) et devraient faire l'objet d'une attention particulière en lien avec les connaissances scientifiques publiées.

Bibliographie :

- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 112:524–531; doi:10.1289/ehp.6649.
- Kraemer FB, Shen W-J, Harada K, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, et al. 2004. Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol Baltim Md* 18:549–557; doi:10.1210/me.2003-0179.
- Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L, Prejbisz A, Robledo M, Taieb D, et al. 2020. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 38:1443–1456; doi:10.1097/HJH.0000000000002438.
- Oh YJ, Jung YJ, Kang J-W, Yoo YS. 2007. Investigation of the estrogenic activities of pesticides from Pal-dang reservoir by in vitro assay. *Sci Total Environ* 388:8–15; doi:10.1016/j.scitotenv.2007.07.013.
- Reif DM, Martin MT, Tan SW, Houck KA, Judson RS, Richard AM, et al. 2010. Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data. *Environ Health Perspect* 118:1714–1720; doi:10.1289/ehp.1002180.

Contribution personnelle : Incertitudes dans les évaluations des dossiers réglementaires analysées par le GT

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Bernard Salles

Co-signataire : Sylvie Bortoli, Thomas Claudepierre

Tout résultat expérimental qu'il soit issu des laboratoires industriels, de CRO ou de laboratoires académiques est porteur d'incertitudes. Les données expérimentales issues de la recherche académique sont évaluées par les pairs et l'incertitude diminue en fonction de la méthodologie expérimentale partagée, de la communication des données brutes et de la reproductibilité de l'expérience publiée par d'autres laboratoires. Les expérimentations menées par les industriels pour répondre aux exigences réglementaires aboutissent à des dossiers évalués par des experts issus d'agences nationales et européenne pour une décision sur une autorisation de mise sur le marché d'une substance ou d'un mélange.

Contrairement à la recherche académique, les études clés des industriels dont les résultats permettent de déterminer une NOAEL ou LOAEL très souvent uniques. Cependant, des études sur d'autres espèces animales ou d'autres tests *in vitro* permettent de croiser les résultats afin de diminuer l'incertitude. Des études *in vitro* ou *in vivo* peuvent être demandées en complément d'information par les groupes d'experts des agences, mais sans assurance qu'elles soient acceptées et donc conduites.

Comme pour la littérature scientifique, certains dossiers revus sont très bien construits et les résultats des études sont robustes laissant peu de place à l'incertitude. Pour d'autres dossiers, des interrogations ont ouvert la voie à des discussions entre experts conduisant à la remise en cause de plusieurs VTR. Des discussions ont porté sur les données rapportées qui étaient de mauvaise qualité expérimentale et conduisaient en conséquence à des résultats peu fiables. Par exemple, les experts du GT ont accepté une étude unique de faible qualité utilisée pour déterminer une VTR, car l'alternative aurait été de ne pas donner de valeur réglementaire pour une exposition au produit phytosanitaire étudié.

1- Évaluation globale des incertitudes

Quels indicateurs peut-on utiliser pour évaluer la qualité des données expérimentales et leur utilisation dans la détermination des VTR des fongicides SDHI ? L'analyse est restreinte aux documents rapportant l'analyse des pays rapporteurs et non aux dossiers expérimentaux *per se*. Dans certaines situations, à la demande de notre groupe d'experts, sur la base d'un questionnement, un dossier expérimental complet a été communiqué et examiné.

Un premier élément d'analyse réside dans le nombre de VTR qui ont été modifiées par les membres du GT. En fait, la majorité des VTR a été validée par les membres du GT, mais de nouvelles valeurs ont été proposées soit 3/14 pour l'AOEL, 5/14 pour l'ADI et 2/11 pour l'ARfD. Ces modifications reposent quasi-exclusivement sur des valeurs de NOAEL requalifiées en LOAEL avec pour conséquence un facteur de sécurité supérieur à 100 (généralement 300). Ce constat correspond à une analyse des dossiers différente entre groupes d'experts ce qui illustre des divergences dans l'analyse des résultats expérimentaux qui repose pour partie sur l'incertitude attachée aux résultats des études.

Un second élément d'analyse concerne le score du niveau de confiance accordé pour chaque VTR. La qualité des données apparaît dans la cotation sur les critères suivants : convergence des études (1 à 5 points/20), durée (1 à 5 points/10) et la discutable valeur sur la qualité de l'étude (1 à 5 points/10) car déclinée sur la base de la cotation de Klimisch.

La valeur du niveau global de confiance est partiellement dépendante de la qualité des données expérimentales ($\leq 30\%$ du score final) ce qui correspond à un indicateur faible. La répartition des valeurs indique que la grande majorité des données utilisées pour le calcul des VTR et le résultat ne sont pas remis en question. Cependant un niveau d'incertitude est partagé par les membres du GT puisqu'aucune valeur de niveau de confiance « fort » n'a été attribuée et que près de 20% des valeurs correspondent aux niveaux « faible / faible moyen ».

2- Constat sur des lacunes et incertitudes des données

2.1- Pertinence du modèle

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés pour des études de toxicologie qui suivent les lignes directrices OCDE. Dans le cas des SDHI à la lumière des connaissances sur l'impact d'une perturbation du complexe II mitochondrial des effets toxiques vis-à-vis d'organes peuvent être associés à un MoA impliquant la fonction mitochondriale (voir chapitre 8), et qui n'a été discuté dans aucun des dossiers étudiés.

L'argument du modèle non extrapolable aux pathologie humaines est avancé pour les maladies suivantes :

- adénome ovarien chez la rate (incidence 12%) exposée au penflufen
- adénocarcinome de l'utérus (incidence 17%) chez la rate exposée au sedaxane
- astrocytome (incidence 5%) et sarcomes histiocytaire (5/5/8% aux 3 doses) chez le rat mâle exposé au penflufen
- il est rappelé en citant l'effet du phénobarbital que le rongeur n'est pas un modèle adapté pour évaluer la cancérogénèse du foie ou de la thyroïde. Cette conclusion est acceptable quand des expérimentations sont bien menées avec des résultats fiables et cohérents : activation de CAR, étude chez des souris CAR-/-, dosages des enzymes du métabolisme hépatique, dosages des hormones voire des enzymes impliquées dans la régulation de la fonction thyroïdienne. Ces expérimentations sont trop rarement entreprises (voir chapitre 8.2 et 8.3)
- phéochromocytomes chez le rat exposé pendant deux ans au bixafen
- adénocarcinome utérin chez la rate exposée pendant deux ans à l'isopyrazam
- microphthalmies dans une étude de reproduction chez la lapine exposée à l'isopyrazam (voir chapitre 8.5)
- néphropathie progressive chronique chez le rat (penthiopyrad)

De plus, les rongeurs sont hypermétaboliques, pour maintenir la température corporelle. Baisser cette température devient alors un moyen de compenser un problème métabolique. Ainsi les souris peuvent entrer en torpeur. Ces évènements peuvent échapper aux tests réglementaires alors qu'ils indiquent un effet bien réel.

Concernant spécifiquement l'évaluation de la cancérogénicité potentielle des SDHI, il est utile de s'interroger sur la pertinence d'un raisonnement analogique sur la base de tumeurs retrouvées chez des patients présentant des mutations des gènes codants pour une des sous-unités de la SDH. Concernant la neurotoxicité, les modèles rongeurs sont très largement utilisés pour l'étude expérimentale des mécanismes impliqués dans la maladie de Parkinson, notamment suite à des expositions à des substances chimiques neurotoxiques. Néanmoins, des études disponibles dans les dossiers réglementaires sont réalisées sur des espèces autres que les rongeurs telles que le chien et/ou le lapin, et leur développement permettrait de discriminer les effets dus aux spécificités du modèle rongeur des effets transposables à l'humain.

Les études d'exposition à moyen et long terme demandées dans les études réglementaires représenteraient par ailleurs un contexte approprié pour étudier les modalités d'apparition d'une maladie de développement lent suite à des expositions à des facteurs neurotoxiques. Il est également important de souligner au regard de certaines maladies, et sur la base de travaux expérimentaux menés chez les rongeurs, que l'impact de ces expositions pourrait être beaucoup plus important dans des fenêtres de vulnérabilité particulière, par exemple pendant la grossesse ou chez le sujet âgé. Des éléments déclencheurs (tel que le stress) peuvent être nécessaires pour déclarer une maladie suite à une atteinte mitochondriale. Or, les conditions expérimentales des études de toxicologie sont mises en œuvre de sorte à éviter un stress chez les animaux (alimentation et eau *ad libitum*, etc). Ces études pourraient donc ne pas être suffisamment sensibles pour mettre en évidence des effets liés à cette inhibition de la SDH.

2.2- Qualité des valeurs expérimentales

Certains des résultats sont discutables non pas d'après le schéma expérimental consigné dans les lignes directrices OCDE mais plutôt sur le suivi de ces lignes directrices. Des exemples relèvent des déficiences en cours d'étude comme une mortalité élevée en exposition chronique, une utilisation de tests statistiques non applicables au nombre et à la répartition des valeurs expérimentales, une dispersion des valeurs dans le groupe contrôle.

Des divergences vis-à-vis de lignes directrices OCDE observés dans les rapports notamment :

- Etude follow up en neurotoxicité chez le rat avec 1 mesure « pretreatment » et 1 mesure à D0. Absence de mesure à 7 jours ou 14 jours après traitement (fluopyram)
- Test du micronoyau *in vivo* sur moëlle osseuse chez la souris avec un résultat négatif mais l'analyse de 1000 érythrocytes polychromatiques au lieu de 4000 (flutolanil).
- Pharmacocinétique : Valeur de l'absorption par gavage (68%) d'une solution de fluxapyroxad dans 0.5% CMC contenant 1% cremophor et étude en toxicité aigue chez le rat avec une solution sans cremophor.
- Non respect des intervalles de dose en exposition chronique.

Les recommandations des lignes directrices OCDE 452-453 mentionnent « des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes, et un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (correspondant par exemple à un facteur de plus de 6 à 10) entre les doses. En général, les facteurs supérieurs à 10 sont évités, et leur utilisation est justifiée ».

Dans les dossiers, la pente de la courbe de toxicité n'est pas évoquée alors que cette donnée aurait pu justifier les intervalles choisis (>4) pour les doses d'exposition. Des exemples d'intervalles de dose non respectés (en ppm) :

50/300/2000 rat 2 ans (bixafen); 200/800/2000/20 000 chien 1 an (boscalid); 100/500/2500/15 000 rat 2 ans (boscalid); 20/200/400 rat 2 ans (carboxine); 100/1000/10 000 chien 90 j et 200/600 puis 60/200/6000 chien 1 an (isofetamid); 30/100/500/5000 rat 2 ans (isofetamid); 100/500/3000 rat 2 ans (isopyrazam)

L'utilisation d'intervalles de doses de valeur >5 sans explication est source d'incertitude. En outre un facteur d'incertitude repose sur le choix de la dose la plus faible qui correspond à une LOAEL et non à une NOAEL.

Une mortalité excessive

Une forte mortalité dans des études de cancérogenèse chez les contrôles est rapportée ce qui contribue à l'obtention d'un résultat avec une faible puissance statistique. Des croquettes carencées en vit K3 a été donnée aux rats lors d'essais d'exposition subaiguë et chronique et ont ensuite été remplacées avec une supplémentation en excès en vit K3 (bixafen). La mortalité élevée (de plus de 50%) dans l'étude 2 ans chez le rat mâle est d'environ 50% (contrôle et traités), alors que la mortalité est faible chez les femelles. Les tests statistiques sont donc conduits sur environ 25 cas au lieu de 50/60. Si la carence en vitK3 est à l'origine de la mortalité excessive, la question d'un dimorphisme sexuel n'a pas été soulevée.

Dans l'étude à 2 ans d'exposition au fluopyram, la mortalité était chez les rats mâles de 62% (contrôles) et de 56 à 81% (traités) et chez les femelles de 31% (contrôles) et de 42 à 53% (traités). Les causes probables de ces mortalités excessives ne sont documentées dans les dossiers.

Dans l'étude 2 ans chez les rats mâles exposés au penflufen la mortalité est de 57% (contrôles) et de 57 à 32% (traités) et chez les femelles de 48% (contrôles) et 27 à 38% (traités).

Une utilisation des tests statistiques non pertinente :

L'utilisation de résultats « statistiquement significatifs » implique en cas de positivité que l'effet biologique est dû à la substance active et en cas de négativité qu'on observe une absence d'effet. Ce raisonnement n'est pas discuté, bien que des effets biologiques puissent ne pas être identifiés en raison du modèle, de l'échelle de dose, de la voie d'administration, de la fenêtre d'exposition... non pertinents.

A propos des tests statistiques utilisés ils doivent tenir compte de la variabilité des valeurs. Un test de tendance peut être utilisé pour confirmer la possibilité d'un effet.

Pour quelques dossiers, dont les données brutes ont été communiquées, des tests statistiques adéquats ont été conduits et parfois, contrairement aux résultats non significatifs rapportés, la différence entre les groupes traités et le groupe contrôle est trouvée significative. Par exemple :

- des constantes en biochimie clinique avec des différences significatives pour l'étude 90 jours chez le rat (benzovindiflupyr)
- l'incidence des hépatocarcinomes chez le rat mâle (8%) (carboxine)

-
- l'incidence des adénomes pulmonaires chez la souris mâle (34%) et kystes ovariens chez la souris (carboxine)

2.3- Traitement des données

Le traitement des données dans certains dossiers a montré des résultats positifs qui n'ont pas été pris en compte, ou n'ont pas provoqué d'expérimentations complémentaires pour valider un MoA. Quelques arguments sont avancés, outre ceux déjà discutés précédemment quant à la transposabilité du modèle rongeur ou l'incertitude sur les données, pour ne pas ouvrir à la discussion sur des résultats positifs.

Une hypertrophie des cellules folliculaires de la thyroïde est observée chez le chien exposé au penflufen pendant 1 an. Puisque le modèle rongeur n'est pas extrapolable aux humains et bien que cette affirmation soit discutable, il aurait été utile dans ce cas que des dosages hormonaux soient demandés pour évaluer la régulation de la fonction thyroïdienne. Aucun dosage n'est rapporté chez le chien.

L'observation d'une augmentation d'incidence de tumeurs hépatiques chez le rat exposé pendant 2 ans au penflufen a ouvert à des expérimentations complémentaires. Une absence d'induction de prolifération d'hépatocytes humains est rapportée ce qui suggère une absence d'activation de CAR. Cependant les hépatocytes proviennent d'un seul donneur et le résultat aurait dû être conforté avec un autre prélèvement et/ou une expérimentation chez des souris ou des rats ou des cellules CAR-/-.

L'argument très souvent utilisé seul ou associé à d'autres remarques citées précédemment pour ne pas tenir compte de résultats positifs fait état de valeurs qui entrent dans la plage de valeurs des contrôles historiques (HCD) de la société ou du CRO. Ces contrôles historiques sont principalement utilisés pour invalider des résultats de cancérogenèse et parfois de génotoxicité. Une première remarque concerne les bases de données des HCD qui en très grande majorité des dossiers ne sont pas établies selon les recommandations de l'OCDE. Une seconde remarque concerne la RITA base (registry of industrial toxicology animal-data) qui a enregistré depuis 1988, 213 études chez le rat (79 056 cas) et 131 études chez la souris (42 241 cas). Le recours à cette base est utilisé pour augmenter la taille du groupe contrôle, et de fait, a pour conséquence d'exclure du seuil de significativité certaines observations. Une troisième remarque a trait au mésusage récurrent des contrôles historiques qui prennent parfois le pas sur les contrôles internes des études. Or leur but initial est d'être utilisé pour vérifier la dérive génétique d'un élevage par rapport à la souche originelle. Les contrôles historiques permettent donc en premier lieu de valider les souris contrôles du laboratoire mais ne devraient pas servir à récuser un effet dans le groupe d'animaux traités. Une quatrième remarque est en rapport avec une divergence entre contrôles historiques et internes ce qui devrait à l'inverse des pratiques observées dans les dossiers réglementaires, conduire à reprogrammer l'expérimentation.

Quelques exemples :

- Adénome et carcinome des cellules folliculaires de la thyroïde chez le rat exposé à l'isofetamid avec une incidence de 7.8% chez les mâles (maximum des valeurs HCD 2007-2016 : 11.7%, moyenne 3.9%) et de 5.8% chez les femelles (maximum des valeurs HCD : 3.9%, moyenne 0.8%). Si la valeur de l'incidence chez le mâle peut être discutée sur la base des HCD, tel n'est pas le cas pour les femelles.

-
- Adénome des cellules folliculaires de la thyroïde chez le rat exposé à l'izopyrazam avec une incidence supérieure aux valeurs des contrôles historiques mais entrant dans la base RITA 1983-2004. Il est inacceptable d'utiliser la base RITA.
 - tumeurs thyroïdiennes chez les rates (selon la dose 3.3-8.3%) exposées au bixafen. HCD 1997-2007 pour invalider cet effet alors que la valeur maximale est de 2.9% et la moyenne de 0.75%. Valeurs expérimentales n'entrent pas dans la base HCD.
 - adénomes des cellules C thyroïdiennes chez des rats femelles (11.8%) et mâles (9.8%) après exposition à l'isofetamid au prétexte que les valeurs entraient dans celles des HCD 2007-2013. Or les valeurs des contrôles historiques sont de 0-7.8%/moyenne 4.25% pour les femelles et de 1.96-7.84/moyenne 5.6% pour les mâles. Les valeurs expérimentales n'entrent pas dans base HCD.

Lorsque l'incidence des tumeurs est statistiquement significative dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle et que les valeurs n'entrent pas dans celles des contrôles historiques, parfois comme mentionné ci-dessus en contradiction avec les données, l'expert de l'étude conclut à une absence d'effet cancérigène sur la base des arguments suivants et qui peuvent être conjugués : absence de dose réponse, substance non génotoxique alors qu'un potentiel effet cancérigène avec ces agents relève plutôt d'un mécanisme épigénétique par exemple le phéochromocytome et adénome bénin chez le rat (8.3%) exposé au bixafen qui n'est pas génotoxique et enfin le modèle animal qui ne peut être extrapolé à la pathologie des humains.

Une voie pour limiter l'incertitude aurait été de rechercher un lien potentiel entre les observations isolées et à fortes doses et un possible mécanisme d'action SDHI.

Les conclusions des experts des agences sont retraintes à la santé humaine et ne prennent pas en compte le concept « une seule santé » avec de potentiels effets délétères sur les écosystèmes et un retour vers la santé humaine.

La littérature scientifique est trop souvent absente des dossiers bien que non négligée par les toxicologues de l'industrie. Cette vacuité d'information complémentaire maintient le facteur d'incertitude qui représente un axe de la politique menée par l'industrie chimique, politique analysée par des sociologues et économistes depuis des décennies avec par exemple la mise en perspective de controverses comme par exemple l'usage du tabac et les effets sur la santé des humains.

3- Les mélanges et les incertitudes associées à leur emploi

Outre ces observations décrites ci-dessus sur l'incertitude expérimentale il serait utile de prendre en compte des substances phytopharmaceutiques agissant sur d'autres complexes mitochondriaux que la SDH. Certains, comme la roténone, inhibitrice du complexe I, sont désormais interdits mais d'autres inhibiteurs du complexe I, tel le tebufenpyrade, peuvent être utilisés (tout en faisant l'objet actuellement d'investigations plus poussées de l'EFSA). D'autres encore, comme les strobilurines, des inhibiteurs du complexe III, peuvent se trouver associées à des SDHI dans les formulations de pesticides. Il est à noter que l'implication de ces deux complexes représente l'un des mécanismes majeurs impliqués dans la physiopathologie moléculaire de la maladie de Parkinson et des maladies apparentées.

Il serait enfin utile de s'intéresser à de possibles phénomènes de synergie ou de potentialisation lors d'exposition cumulée à :

- plusieurs substances inhibant la SDH *via* des mécanismes d'action similaires ou différents ;
- des molécules agissant sur différentes cibles mitochondriales.

Ainsi, l'analyse des dangers suite à une exposition à des substances actives seules est imparfaite et il serait utile d'évaluer la toxicité des mélanges et en particulier ceux retrouvés dans les formulations.

Contribution personnelle : Etudes sur les organismes de l'environnement

Cette contribution personnelle n'a pas été validée par l'ensemble du GT. Elle est endossée par les experts ci-dessous.

Sylvie Bortoli

Co-signataires : Laurence Huc, Anthony Lemarié, Thomas Claudepierre

Contexte

La revue de la littérature réalisée dans le cadre de ce GT, visait à analyser les effets critiques liés à une inhibition de la SDH. La requête bibliographique telle que décrite dans le tableau 60 de l'annexe 2 a fait apparaître un certain nombre d'articles portant sur les effets d'une exposition aux fongicides SDHi sur des espèces représentatives de la biodiversité telles que le collembole, le nématode, l'amphipode aquatique, le coléoptère, le crustacé planctonique, la truite et l'abeille. D'autres articles portaient sur l'étude de l'impact des SDHi dans des modèles animaux prédictifs comme le poisson-zèbre et le xénope, largement utilisés en toxicologie pour étudier, à l'échelle d'un organisme entier, des mécanismes de toxicité potentiellement pertinents pour l'humain. Si cette littérature n'a pas pu être utilisée pour la révision des VTR, elle est néanmoins utile pour analyser les conséquences d'une exposition de ces organismes à ces pesticides mitotoxiques et pour identifier des mécanismes de toxicité pertinents à explorer chez l'humain et des événements clés utiles dans la constructions d'AOPs.

Analyse des articles sélectionnés par le GT SDHi dans le cadre de la recherche bibliographique

Parmi les articles analysés, le SDHi le plus étudié est le boscalid, seul ou en association avec un autre fongicide. La plupart des études sélectionnées se sont intéressées aux altérations de la reproduction et du (neuro)développement, et quelques-unes ont rapporté des effets sur certains paramètres métaboliques et sur le stress oxydant.

Une exposition au **boscalid** (3 – 120 nM) pendant 2 semaines a été réalisée chez des amphipodes aquatiques (*Allorchestes compressa*) et semi-aquatiques (*Austrochiltonia subtenuis*). Lorsque ces espèces sont exposées au stade juvénile, le boscalid induit une diminution de la survie des individus de manière dose-dépendante. La croissance des amphipodes est diminuée, aboutissant à une réduction de la taille, plus marquée chez les femelles que chez les mâles, et à une déformation des antennes chez *Allorchestes compressa* (Vu et al., 2016). Chez *Austrochiltonia subtenuis*, des anomalies métaboliques sont observées avec une diminution de la quantité de lipides, de glycogène et de protéines. L'exposition au boscalid induit une diminution du nombre de femelles gravides, du nombre d'embryons par femelle gravide et au final, aucune descendance n'est observée. Lorsque les amphipodes sont exposés au boscalid à un stade de développement plus tardif, la survie des individus n'est pas altérée. Par contre, le boscalid diminue le nombre de femelles gravides, le nombre de juvéniles, le sexe ratio femelle:mâle et la taille des juvéniles mâles et femelles (Vu et al., 2017). Cet effet du boscalid sur la fertilité est retrouvé chez le poisson zèbre *Danio rerio*, de manière

dépendante de la dose (0.03, 0.3, 3 μ M) après une exposition de 3 semaines. Des anomalies des gonades sont observées par des marquages histologiques chez les mâles et chez les femelles. Les mâles présentent une dégénérescence des cellules de Sertoli, une diminution de l'espace interstitiel des tubules séminifères, une augmentation du pourcentage de spermatoocytes et une diminution du pourcentage de spermatides. Les femelles présentent une réduction des oocytes vitellogéniques de stade tardif ainsi que des dépôts interstitiels d'hémossidérine (pigments ferrugineux issus de la dégradation de l'hémoglobine) dans les ovaires, qui s'accompagnent d'exsudats protéiques et d'infiltrations inflammatoires (Qian et al., 2020). Des études de « molecular docking » (utilisées pour prédire si/comment une molécule interagit physiquement avec une autre) montre que le boscalid peut se lier au récepteur aux œstrogènes. Cette observation est associée à une augmentation significative de la concentration en 17β -œstradiol chez les femelles et à une augmentation chez les mâles. Par ailleurs, l'expression de gènes liés à l'axe hypothalamus-glande pituitaire-gonades-foie est significativement altérée et positivement corrélée avec les concentrations en 17β -œstradiol chez les femelles et les mâles (Qian et al., 2020). Chez le coléoptère *Leptinotarsa decemlineata*, identifié comme ravageur de la pomme de terre, une analyse transcriptomique a été réalisée après une exposition au boscalid (13 μ g/ μ L, 38 mM), au fongicide chlorothalonide ou à l'insecticide imidaclopride dans le but d'évaluer si ces composés induisent les mêmes voies de détoxification. Les résultats montrent que le boscalid n'active pas les mêmes voies de détoxification que le chlorothalonide et l'imidaclopride (cytochrome P450 6k1 isoforme XI et UDP-glucuronosyltransférase 2B7-like) (Clements et al., 2018). Une revue de la littérature consacrée à l'état de la recherche sur les effets des fongicides et des herbicides chez l'abeille indique que le boscalid est l'un des fongicides les plus étudiés (Cullen et al., 2019). Ainsi chez l'abeille nourricière (nurse bee), une exposition pendant 21 jours au boscalid en association avec la pyroclostrobine (formulation Pristine®) par voie alimentaire (pollen traité) induit des modifications du microbiote avec une diminution du nombre de familles de bactéries composant la flore intestinale de l'abeille, et une diminution de leur proportion relative (diminution de l'abondance de *Gilliamella sp* et augmentation de l'abondance de *Lactobacillus sp Firm 4 and Firm 5*) (DeGrandi-Hoffman et al., 2017). Chez le crustacé planctonique *Daphnia magna*, le boscalid induit un stress oxydant, avec une altération de l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion-S-transférase (significative dès 7.5 μ M) et une augmentation de la peroxydation lipidique (significative à 15 μ M). Une diminution de la fréquence des mues, du nombre de nouveau-nés et du nombre de couvée/femelle (significative à 15 μ M) est également observée (Aksakal, 2020). Enfin chez l'annélide estuarien *Simplisetia aequisetis* exposé au boscalid à 75 mg/L (0.2 mM) pendant 2 semaines, l'analyse du métabolome montre une diminution de la quantité de métabolites du cycle de Krebs et du cycle de l'urée, ainsi qu'une réduction de la quantité de certains acides aminés tels que la serine, la thréonine, l'hydroxyproline et l'asparagine (Sinclair et al., 2019).

Une toxicité est également observée en réponse à une exposition au **flutolanil** chez l'embryon de poisson-zèbre exposé à des doses comprises entre 1.5 et 3.1 mg/mL (4.6 et 9.6 μ M) avec une diminution des mouvements spontanés dès 1.5 mg/mL à 24 hpf et un ralentissement du rythme cardiaque à partir de 2.5 mg/mL (7.7 μ M) à 48 hpf. Les effets du flutolanil sur le taux d'éclosion ont également été mesurés. L'éclosion de l'embryon est le résultat combiné de processus biochimiques et de processus mécaniques liés au comportement de l'embryon. D'une part, certaines cellules de l'embryon en train d'éclore sécrètent des enzymes d'éclosion qui dissolvent le chorion. D'autre part, les mouvements spontanés de l'embryon exacerbent la destruction du chorion (De Gaspar et al., 1999). Le flutolanil affecte négativement le taux d'éclosion à 72 hpf dès 1.8 mg/mL (5.6 μ M) et la taille des larves est diminuée à partir d'une

exposition à 2.2 mg/mL (6.8 µM) (Yang et al., 2016). Des effets tératogènes sont également observés, incluant un œdème péricardique, un œdème du sac vitellin, une déformation du sac vitellin et une déformation de la colonne vertébrale (Yang et al., 2016).

Les effets de la **carboxine** ont été étudiés dans 2 autres espèces de poisson (la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss* et la carpe *Cyprinus carpio*), et chez le collembole *Folsomia candida*. Chez la truite arc en ciel, les poissons ont été exposés à la carboxine pendant 1 semaine à la concentration de 3.85 mg/L (15 µM). L'analyse du stress oxydant dans des homogénats de foie a révélé une augmentation significative de l'activité glutathion-S-transférase et des niveaux de malondialdéhyde (Aydin et al., 2012). Dans l'étude de Farsani et al., les carpes (âge non précisé) ont été exposées à une dose sub-létale (10, 25 et 50% de la LC50 : 5, 15, 30 mg/L) d'un mélange de carboxine et de thiram de la formulation Vitavax Thiram (quantité relative de chaque pesticide non précisée dans l'article mais selon EPHY 50 :50). Les poissons exposés présentent un comportement anormal caractérisé par une accélération de la nage operculaire, associé à une protubérance des yeux, des ecchymoses au niveau de la nageoire caudale et des lésions des branchies. Ces observations s'accompagnent d'une augmentation de la glycémie et une diminution des protéines totales (Farsani et al., 2015). Enfin chez le collembole *Folsomia candida* exposé à une mélange carboxine-thiram 0.06 - 1 mg/kg de poids sec de sol artificiel, aucun effet létal et aucune altération de la reproduction ne sont relevés (Alves et al., 2014)

L'utilisation du **fluopyram** comme nématicide est rapporté dans les études de Wram et al. (2019) et de Liu et al. (2020). Chez le nématode *Meloidogyne incognita*, les effets du fluopyram (formulation Velum) sont comparés à ceux de l'oxamyl (formulation Vydate), du fluazaindolizine (formulation Salibro) et du fluensolfone (formulation Nimitz). Le fluopyram apparait comme le nématicide le plus puissant, avec des doses efficaces 230 fois plus basses que les autres nématicides. Il induit une diminution de la mobilité et de l'activité des nématodes mais n'affecte pas leur reproduction (Wram et al., 2022). Chez le nématode *Bursaphelenchus xylophilus*, un nématode qui infecte le tronc des pins, le fluopyram altère le développement des larves, avec des effets d'autant plus marqués que le stade de développement est précoce. Le fluopyram diminue significativement le taux d'éclosion des larves et inhibe la reproduction des adultes (Liu et al., 2020).

Autres sources et analyses

D'autres articles, non sélectionnés par la requête bibliographique, ont fait l'objet d'une analyse dans le rapport d'expertise collective de l'INSERM (2021, P.917-923) ("Pesticides," 2020):

- Chez le poisson-zèbre, plusieurs travaux rapportent des effets toxiques comprenant notamment des anomalies du développement (œdèmes péricardiques, scolioses, hypopigmentation), du neurodéveloppement et du comportement. Certains de ces effets sont associés à des anomalies de la structure et de la fonction des mitochondries avec notamment un stress oxydant, l'induction de l'apoptose et une altération du métabolisme glucido-lipidique. Certains SDHi présentent des effets de perturbation endocrinienne chez l'embryon avec l'augmentation de la production de l'hormone de croissance (thifluzamide ≥ 0.19 mg/L) et l'augmentation de la production des hormones T3 et T4 associée à l'augmentation de l'expression du récepteur de la TSH (flutolanil ≥ 0.5 mg/L). Chez l'adulte, le thifluzamide stimule l'expression de l'hormone de croissance dans le foie ainsi que la sécrétion de leptine. Le flutolanil (≥ 25 µg/L) augmente la concentration de 17β -œstradiol chez le poisson mâle, et diminue la concentration de testostérone. Chez le poisson femelle, le flutolanil induit une hausse

de la concentration plasmatique de 17β -œstradiol et perturbe le profil de méthylation génomique dans les cellules ovariennes. Ces effets entraînent une reprotoxicité avec une diminution de la taille des embryons issus du croisement des poissons exposés et une augmentation de leur mortalité. Le boscalid présente également un effet œstrogène-mimétique chez le poisson mâle (1 mg/L) et anti-œstrogénique chez le poisson femelle (≥ 0.01 mg/L), entraînant une perturbation de la fertilité. Enfin, chez le poisson adulte, tous les SDHi testés présentent des effets hépatotoxiques avec des lésions hépatocytaires (vacuolisation) observées à partir de 21 jours d'exposition au thifluzamide (0.19 mg/L), après 28 jours d'exposition au boscalid (0.1 mg/L) et après 60 jours d'exposition au flutolanil (0.05 mg/L). Des anomalies histopathologiques de la rétine et du cerveau ont également été mises en évidence chez le poisson adulte exposé au boscalid (1 mg/L) pendant 21 jours.

- Chez l'amphibien *Xenopus tropicalis*, des effets tératogènes ont été observés après une exposition au bixafen (≥ 0.3 μ M) avec un retard d'éclosion associé à une hypopigmentation, une déformation de la queue, une courbure anormale de la colonne vertébrale et une anomalie du sac vitellin. Des effets similaires ont été observés après une exposition au bixafen ou à l'isopyrazam, seuls ou associés à une strobilurine, avec des microcéphalies, des défauts de la mise en place des somites, une hypopigmentation, et une diminution de la taille des nageoires.

Pour finir, un corpus d'articles non présélectionnés par la requête bibliographique pour figurer dans la présente analyse a été examiné dans une revue récemment publiée sur la toxicité des SDHi chez le poisson zèbre (Yanicostas and Soussi-Yanicostas, 2021). En substance, cette revue rapporte les effets de plusieurs SDHi sur le développement du poisson zèbre, avec des malformations du sac vitellin, des nageoires, de la tête, de la queue et du cœur, et du neurodéveloppement, avec des anomalies de différenciation et de fonctionnement du système nerveux central (incluant une microcéphalie et des malformations de la rétine) associées à des déficits comportementaux et locomoteurs. Chez le poisson adulte, le foie et la thyroïde sont clairement identifiés comme des organes/fonctions cibles. Certains SDHi induisent un stress oxydant lié à un dysfonctionnement mitochondrial (boscalide, fluxapyroxade, isopyrazam, sedaxane, thifluzamide, flutolanil), et une altération du métabolisme glucido-lipidique (thifluzamide, boscalide). Le flutolanil est par ailleurs décrit comme un perturbateur endocrinien, avec une dérégulation de l'homéostasie de hormones thyroïdiennes et de la stéroïdogenèse (Yanicostas and Soussi-Yanicostas, 2021).

Conclusion

Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) sont historiquement utilisés pour limiter la prolifération de moisissures pathogènes. Ils ont pour cible la succinate déshydrogénase, un complexe enzymatique présent dans les cellules des êtres vivants qui possèdent des mitochondries. La conservation de la SDH à travers les espèces laisse supposer un possible effet des SDHi dans des espèces non-cibles. Cette hypothèse est supportée par l'extension de l'utilisation de cette famille de fongicides pour des usages nématicides et acaricides.

L'analyse présentée est loin d'être exhaustive, mais elle souligne certaines analogies avec les organes identifiés comme cibles par le GT et les effets adverses observés dans les dossiers réglementaires. Elle souligne une susceptibilité des espèces de la biodiversité vis-à-vis des fongicides SDHi qui pourrait bouleverser les équilibres écologiques, avec des conséquences possibles pour la santé animale et la santé humaine. L'étude des effets délétères des SDHi sur des organismes non mammifères apparaît utile dans l'évaluation de la toxicité de ces fongicides, dans la mesure où elle est susceptible d'apporter des connaissances qui pourraient

renforcer les données provenant des dossiers d'évaluation réglementaire, dans un contexte où la littérature scientifique académique ne rapporte, à ce jour, que très peu de travaux sur l'impact des SDHi sur la santé humaine. Enfin, cette analyse renforce la recommandation 5 portant sur l'évaluation des effets des SDHI sur les écosystèmes et leur impact sur la biodiversité

Références

- Aksakal, F.I., 2020. Evaluation of boscalid toxicity on *Daphnia magna* by using antioxidant enzyme activities, the expression of genes related to antioxidant and detoxification systems, and life-history parameters. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 237, 108830. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108830>
- Alves, P.R.L., Cardoso, E.J.B.N., Martines, A.M., Sousa, J.P., Pasini, A., 2014. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 105, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.010>
- Aydin et al., 2012. Effects of Carboxin on Glutathione-S-Transferase Enzyme Activite in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterniary Advances* 2716–2720.
- Clements, J., Sanchez-Sedillo, B., Bradfield, C.A., Groves, R.L., 2018. Transcriptomic analysis reveals similarities in genetic activation of detoxification mechanisms resulting from imidacloprid and chlorothalonil exposure. *PLoS One* 13, e0205881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205881>
- Cullen, M.G., Thompson, L.J., Carolan, J.C., Stout, J.C., Stanley, D.A., 2019. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS One* 14, e0225743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225743>
- De Gaspar, I., Blanquez, M.J., Fraile, B., Paniagua, R., Arenas, M.I., 1999. The hatching gland cells of trout embryos: characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *J Anat* 194 (Pt 1), 109–118. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19410109.x>
- DeGrandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., DeJong, E.W., Chambers, M., Hidalgo, G., 2017. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide PristineA (R) consumed in pollen. *Apidologie* 48, 340–352. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0478-y>
- Farsani, H.G., Rashidian, G., Narimanizad, F., Khodadadi, M., Gerami, M.H., 2015. Histopathology and biochemical analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sublethal concentrations of carboxin-thiram (Vitivax thiram). *J. Fish. Aquatic Sci.* 10, 337–346. <https://doi.org/10.3923/jfas.2015.337.346>
- Liu, Guangying, Lin, X., Xu, S., Liu, Guang, Liu, Z., Liu, F., Mu, W., 2020. Efficacy of fluopyram as a candidate trunk-injection agent against *Bursaphelenchus xylophilus*. *European Journal of Plant Pathology* 157. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02023-8>
- Pesticides : Effets sur la santé [WWW Document], 2020. . Inserm - La science pour la santé. URL <https://www.inserm.fr/information-en-sante/expertises-collectives/pesticides-effets-sur-sante> (accessed 11.27.20).
- Qian, L., Qi, S., Zhang, J., Duan, M., Schlenk, D., Jiang, J., Wang, C., 2020. Exposure to Boscalid Induces Reproductive Toxicity of Zebrafish by Gender-Specific Alterations in Steroidogenesis. *Environmental science & technology* 54, 14275–14287. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02871>
- Sinclair, G.M., O'Brien, A.L., Keough, M., de Souza, D.P., Dayalan, S., Kanojia, K., Kouremenos, K., Tull, D.L., Coleman, R.A., Jones, O.A.H., Long, S.M., 2019. Metabolite changes in an estuarine annelid following sublethal exposure to a mixture of zinc and boscalid. *Metabolites* 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9100229>

-
- Vu, H.T., Keough, M.J., Long, S.M., Pettigrove, V.J., 2017. Effects of two commonly used fungicides on the amphipod *Austrochiltonia subtenuis*. *Environ Toxicol Chem* 36, 720–726. <https://doi.org/10.1002/etc.3584>
- Vu, H.T., Keough, M.J., Long, S.M., Pettigrove, V.J., 2016. Effects of the boscalid fungicide Filan® on the marine amphipod *Allorchestes compressa* at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 1130–1137. <https://doi.org/10.1002/etc.3247>
- Wram, C.L., Hesse, C.N., Zasada, I.A., 2022. Transcriptional changes of biochemical pathways in *Meloidogyne incognita* in response to non-fumigant nematicides. *Sci Rep* 12, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14091-3>
- Yang, Y., Qi, S.Z., Chen, J.Y., Liu, Y., Teng, M., Wang, C.J., 2016. Toxic Effects of Bromothalonil and Flutolanil on Multiple Developmental Stages in Zebrafish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 91–97. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1833-4>
- Yanicostas, C., Soussi-Yanicostas, N., 2021. SDHI Fungicide Toxicity and Associated Adverse Outcome Pathways: What Can Zebrafish Tell Us? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12. <https://doi.org/10.3390/ijms222212362>



anses

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr — @Anses_fr