

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 avril 2020

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

relatif à la détermination de la pertinence pour les eaux destinées à la consommation humaine pour les métabolites de pesticides desphényl-chloridazone et méthyl-desphényl-chloridazone

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'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie par la Direction générale de la santé (DGS) pour caractériser la pertinence dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) des métabolites de pesticides suivants : desphényl-chloridazone et méthyl-desphényl-chloridazone.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La directive 98/83/CE¹ fixe des limites de qualité (LQ) dans les EDCH pour les pesticides et leurs métabolites pertinents (0,1 µg.L⁻¹ par substance individuelle et 0,5 µg.L⁻¹ pour la somme des pesticides et métabolites pertinents)², mais ne définit ni ne propose des critères ou des modalités d'évaluation de la pertinence. Ainsi, dans l'attente de lignes directrices définies au niveau européen, et afin de répondre aux enjeux de gestion locale lorsque des métabolites de pesticides sont présents à des concentrations supérieures aux LQ réglementaires dans les EDCH, la DGS a saisi l'Agence pour définir et établir des critères d'évaluation de la pertinence des métabolites de pesticides dans les EDCH (saisine 2015-SA-0252). Ces travaux ont fait l'objet d'un avis en date du 30 janvier 2019³.

La détermination de la pertinence des deux métabolites de pesticides desphényl-chloridazone (DPC) et méthyl-desphényl-chloridazone (MDPC), cités dans le courrier de saisine de la DGS, fait l'objet du présent avis.

¹ Directive 98/83/CE du 3 Novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

² À l'exception de l'aldrine, dieldrine, heptachlore et heptachlorépoxyde pour lesquels la valeur est de 0,03 µg.L⁻¹

³ Anses. (2019). Avis de l'Anses du 30 janvier 2019 relatif à l'évaluation de la pertinence des métabolites de pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». L'Anses a confié l'expertise à des rapporteurs externes pour l'examen du caractère « pertinent pour les EDCH » des deux métabolites. Le projet d'avis a été présenté et validé par le groupe de travail « Évaluation des risques sanitaires associés aux paramètres chimiques des eaux destinées à la consommation humaine » (GT ERS EDCH II) lors de sa réunion du 25 février 2020. Les travaux ont été présentés au CES « Eaux » le 4 février 2020 et adoptés le 10 mars 2020.

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 du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

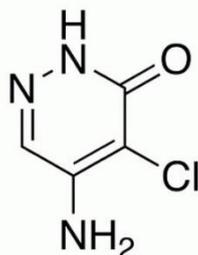
3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ET DU CES « EAUX »

La méthode d'évaluation (schéma de principe en Annexe 1) de la pertinence des métabolites de pesticides pour les EDCH, détaillée dans l'avis susmentionné³, a été appliquée aux deux métabolites de pesticides DPC et MDPC. Les données considérées pour évaluer leur pertinence pour les EDCH sont issues, soit des dossiers disponibles de demande d'approbation des substances actives (SA) dans le cadre de leurs évaluations européennes telles que les rapports d'évaluation européens rédigés par l'État membre rapporteur, soit des conclusions de l'EFSA (« European Food Safety Authority » ou l'Autorité européenne de sécurité des aliments), soit de la littérature scientifique.

3.1. DESPHÉNYL-CHLORIDAZONE

3.1.1. Identification

La DPC, est un métabolite de la SA chloridazone, herbicide de la famille des diazines, réapprouvée le 1^{er} janvier 2009 et dont l'autorisation a pris fin le 31 décembre 2018⁴. Sa dénomination est 5-amino-4-chloropyridazine-3-one et elle est identifiée sous le numéro CAS 6339-19-1. Sa structure est présentée en figure 1.



⁴ Règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 de la commission du 25 mai 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil, en ce qui concerne la liste des substances actives approuvées.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:153:0001:0186:FR:PDF>

Figure 1 : Structure chimique du métabolite desphényl-chloridazone.

3.1.2. Évaluation de la pertinence

Des informations sur l'activité « pesticide » ainsi que des données toxicologiques figurent dans l' « EFSA journal » sous forme de résumés⁵ disponibles sur le site de l'EFSA et dans la monographie européenne (annexes B des volumes B-6 et B-9) datant de 2004⁶. Une recherche bibliographique a été réalisée concernant les effets mutagènes, génotoxiques, cancérigènes, la toxicité pour la reproduction et la potentielle transformation dans les filières de traitement d'EDCH.

Par ailleurs, la SA parente du métabolite, la chloridazone, est classée de manière harmonisée au titre du règlement (CE) n°1272/2008⁷ et ne fait pas l'objet d'un classement pour une propriété cancérigène, mutagène ou reprotoxique⁸.

Examen de l'activité « pesticide »

L' « EFSA journal » de 2007 conclut à l'absence d'activité « pesticide » de la DPC en comparaison avec celle de la chloridazone. En effet, dans les tests d'émergence disponibles pour plusieurs espèces végétales, à des doses représentatives des conditions d'utilisation de la molécule mère, des effets de la DPC inférieurs à 50% de ceux de la chloridazone ont été observés^{6,7}.

En conséquence, la DPC n'est pas classée comme un métabolite pertinent au titre de cette étape. L'évaluation de la pertinence pour les EDCH du métabolite est donc poursuivie.

Examen du potentiel génotoxique

L' « EFSA journal » et le « Draft Assessment Report » (DAR) (annexe B du volume B-6) présentent des résumés synthétiques des résultats d'un test d'Ames, d'un test de mutation génique *in vitro* utilisant le gène hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) et d'un test d'aberration chromosomique *in vitro* sur lymphocytes humains (tableau 1).

⁵ EFSA. (2007). « Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chloridazon. » *EFSA Scientific Report*. 108, 1-82.

⁶ DAR Chloridazon. Annex B. (2004a). «Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany » Chloridazon_DAR_09_Vol 3_B6.pdf

DAR Chloridazon. Annex B. (2004b). «Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. » Chloridazon_DAR_12_Vol 3_B9.pdf

⁷ Règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006

⁸ Chloridazon – Summary of classification and Labelling - Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) N° 1272/2008 : <https://www.echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/60583>

Type d'essai	Système cellulaire	Doses testées	Résultat de l'étude	Ligne directrice
Test d'Ames	Souches TA 98, TA 100, TA 1535 et TA 1537 de <i>Salmonella</i> Typhimurium Dosage sur plaque standard et test de préincubation avec et sans mélange S9 de rat	20 à 5000 µg/plaque avec ou sans activation métabolique (S9 de rat)	négatif	OCDE 471
Test de mutation génique sur cellules de mammifère <i>in vitro</i> (Test HPRT)	Cellules V79 de hamster chinois	31 à 500 µg/mL	négatif	OCDE 476 EEC 87/302 et EPA 870.5300
Test d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> chez les mammifères	Lymphocytes d'origine humaine	100 à 2 000 µg/mL	négatif	OCDE 473

Tableau 1 : Essais de génotoxicité du métabolite desphényl-chloridazone

❖ Test d'Ames

Le test d'Ames a été réalisé en 1992 dans le respect de la ligne directrice OCDE 471 en vigueur. La pureté de la molécule testée était de 98,2 % et la recherche de mutants révertants a été réalisée avec et sans activation métabolique par un mélange S9 de foie de rat, par pré-incubation et par incorporation directe à des doses de 20 à 5 000 µg par plaque et sur les souches TA 98, TA 100, TA 1535 et TA 1537 de *Salmonella* Typhimurium. Le solvant utilisé était le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Il apparaît que la souche TA 102 ou une souche capable de déceler certains mutagènes oxydants, des agents pontants et des hydrazines, n'ont pas été utilisées.

Concernant le système exogène d'activation S9 utilisé dans ce protocole, le CES « Eaux » considère que celui-ci est discutable à la lumière de cas documentés dans la littérature pour lesquels des résultats négatifs sont obtenus pour les amines hétérocycliques en présence de mélange S9 obtenu chez le rat, mais positifs en présence de mélange S9 obtenu chez le hamster⁹.

Cette limite rejoint les conclusions de certaines données bibliographiques concernant spécifiquement les amines aromatiques^{10,11}. Ainsi, tout comme pour les amines aromatiques,

⁹ Hakura A., Shimada H., Nakajima M., Sui H., Kitamoto S., Suzuki S., Satoh T. (2005) *Salmonella*/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds, *Mutagenesis*, Vol. 20, Issue 3, Pages 217–228.

¹⁰ Fassina G., Abbondandolo A., Mariani L., Taningher M., Parodi S. (1990). Mutagenicity in V79 cells does not correlate with carcinogenicity in small rodents for 12 aromatic amines. *J. toxicol. environm. health.* 29. 109-30.

¹¹ Levy D., Zeiger E., Escobar P., Hakura A., Leede B.J., Kato M., Moore M., Sugiyama KI. (2019). Recommended Criteria for the Evaluation of Bacterial Mutagenicity Data (Ames Test). *Mut. Res./Genetic Toxicol. Environm. Mutagenesis.* Vol 848, 403074.

l'activation métabolique d'amines hétérocycliques en présence de *N*-acétyl transférase (NAT) peut conduire à la formation de métabolites mutagènes^{12,13}.

❖ Test de mutation génique sur cellules de mammifère *in vitro*

L'induction de mutation au locus HPRT a été étudiée en 1999 vis-à-vis de cellules V79 de hamster chinois selon des lignes directrices OCDE 476, EEC 87/302 et EPA 870.5300. Les cellules V79 ont été traitées à des concentrations allant de 31 à 500 µg/mL de DPC (pureté 99,8 %), en présence et en l'absence de S9 de foie de rat induit par du phénobarbital et de la bêta-naphthoflavone. Les auteurs précisent que la solubilité limitée dans le DMSO n'a pas permis de tester des doses plus importantes.

Dans le DAR (annexe B du volume B-6), les résultats obtenus ne sont pas détaillés mais seulement résumés et il y est conclu à l'absence de mutagénicité dans les conditions expérimentales testées.

❖ Test d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères

Le potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* a été étudié vis-à-vis de lymphocytes humains. L'étude a été réalisée en 1993 selon la ligne directrice de l'OCDE 473 (révisée en 2016). Les cellules ont été exposées au DPC (pureté 98,2 %) pendant 3 heures à des concentrations comprises entre 100 et 2 000 µg/mL en présence de S9 de foie de rat induit par de l'Aroclor 1254, et pendant une durée inconnue en l'absence d'un système exogène d'activation métabolique. Le CES « Eaux » note que seulement 100 métaphases ont été analysées au lieu des 300 métaphases recommandées dans la ligne directrice OCDE 473 révisée.

Le choix des doses testées apparaît mal justifié dans le résumé et la plus forte dose testée sans activation métabolique est très faible : 10 µg/mL alors qu'une expérimentation sur les deux réalisées à 2 000 µg/mL en présence de S9 a mis en évidence une augmentation non statistiquement significative des métaphases « aberrantes » non reproductible lors de la seconde expérimentation. Le DAR (annexe B du volume B-6) et l'« EFSA journal » concluent qu'aucune preuve d'effet clastogène n'a été observée dans les conditions de cette étude.

Le CES « Eaux » estime toutefois que cette étude présente des déviations importantes avec la ligne directrice actuelle, au premier rang desquelles figurent la justification peu claire du choix des très faibles doses testées sans activation métabolique et le manque de puissance statistique du faible nombre de cellules métaphasiques observées.

❖ Données complémentaires

Par ailleurs, parmi les autres données de toxicologie disponibles dans le DAR, le CES « Eaux » note :

- une étude de toxicité répétée sur 28 jours réalisée en 1977 chez le rat Sprague-Dawley, par voie orale et aux doses de 0, 30, 90 et 270 mg/kg. Des signes de toxicité rénale (augmentation du poids et néphrites) et vésicales (dysplasies) sont notés à la plus forte dose testée ;
- une étude de toxicité répétée sur 90 jours réalisée en 1996 chez le rat Wistar, par voie orale et aux doses de 50, 155 et 310 mg/kg. Des signes de toxicité rénale (hyperplasies) et

¹² Wild D., Feser W., Michel S., Lord HL., Josephy PD. (1995). Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine N-acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in Salmonella typhimurium. *Carcinogenesis*. 16(3):643-8.

¹³ Sadrieh N., Davis CD., Snyderwine EG., (1996). *N*-Acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived Heterocyclic amines in the Human mammary gland. *Cancer Res*. Vol 56. Pages 2683-2687.

- vésicales (hyperplasies) sont notés à la plus forte dose testée de même que des signes d'hépatotoxicité (augmentation du poids, biologie et cytologie) à toutes les doses testées ;
- une étude de toxicité répétée sur 90 jours réalisée en 1996 chez le rat Wistar, par voie orale et aux doses de 0, 15 et 29 mg/kg. Des signes de toxicité rénale et hépatique sont notés à la plus forte dose testée (augmentation du poids) ;
 - une étude de toxicité répétée sur 90 jours réalisée en 1996 chez le rat Sprague-Dawley, par voie orale et aux doses de 0, 30, 90 et 270 mg/kg. Des signes de toxicité rénale et vésicale (augmentation du poids, dilatations, dysplasie) sont notés à la plus forte dose testée.

Le CES « Eaux » souligne que la survenue quasi-systématique des atteintes rénales et vésicales dans les études de toxicité répétée jusqu'à 3 mois constitue un signal d'alerte vis-à-vis d'un potentiel cancérigène que ne dissipent pas la batterie d'essais de génotoxicité/mutagenicité *in vitro* (système d'activation métabolique inadéquat, interrogations sur les conditions expérimentales du test d'aberration chromosomique *in vitro*) et l'absence d'étude de cancérogénèse de la DPC.

Ainsi, considérant :

- le choix du système d'activation métabolique de rat et non de hamster qui aurait été plus judicieux pour le test d'Ames en raison de la structure chimique (amine hétérocyclique) du métabolite,
- les conditions de réalisation du test d'aberration chromosomique *in vitro*,
- la présence d'atteintes rénales et vésicales (hyperplasie, dysplasie) dans les études de toxicité répétée sur 28 et 90 jours associée à l'absence d'étude de cancérogénèse,
- la recherche bibliographique réalisée en complément qui n'a pas apporté d'élément complémentaire pertinent,

le CES « Eaux », après avis de ses rapporteurs, considère qu'il n'est pas possible de conclure sur les potentiels mutagène ou génotoxique de la DPC.

3.1.3. Conclusion du CES « Eaux » sur la pertinence du métabolite desphényl-chloridazone

Sur la base des données des monographies européennes et de la recherche bibliographique réalisée en complément, et selon le schéma décisionnel de détermination de la pertinence dans les EDCH, considérant les doutes et manquements soulevés lors de l'examen des études réalisées pour l'évaluation de son potentiel génotoxique, **le métabolite desphényl-chloridazone est considéré comme un métabolite « pertinent pour les EDCH ».**

3.2. MÉTHYL-DESPHÉNYL-CHLORIDAZONE

3.2.1. Identification

La MDPC est également un métabolite de la SA parente chloridazone, herbicide de la famille des diazines, réapprouvée le 1^{er} janvier 2009 et dont l'autorisation a pris fin le 31 décembre 2018¹⁴. Sa dénomination est 5-amino-4-chloro-2-méthylpyridazine-3-one et elle est identifiée sous le numéro CAS 17254-80-7. Sa structure est présentée sur la figure 2.

¹⁴ Règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 de la Commission du 25 mai 2011 portant application du règlement (CE) no 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil, en ce qui concerne la liste des substances actives approuvées <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:153:0001:0186:FR:PDF>

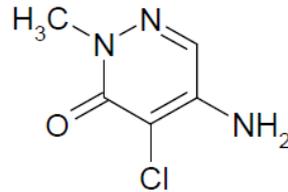


Figure 2 : Structure chimique du métabolite méthyl-desphényl-chloridazone.

3.2.2. Évaluation de la pertinence

Des informations sur l'activité « pesticide » ainsi que des données toxicologiques figurent dans l'« EFSA journal » sous forme de résumés¹⁵ disponibles sur le site de l'EFSA et dans la monographie européenne (annexes B des volumes B-6 et B-9) datant de 2004¹⁶.

Une recherche bibliographique a été réalisée concernant les effets mutagènes, génotoxiques, cancérigènes, la toxicité pour la reproduction, et la potentielle transformation dans les filières de traitement d'EDCH.

La SA chloridazone, est classée de manière harmonisée au titre du règlement (CE) n°1272/2008¹⁷ mais ne fait pas l'objet d'un classement pour une propriété cancérigène, mutagène ou reprotoxique¹⁸.

Examen de l'activité « pesticide »

L'« EFSA Journal » de 2007 conclut à l'absence d'activité « pesticide » de la MDPC en comparaison avec celle de la chloridazone. En effet, dans les tests d'émergence disponibles pour plusieurs espèces végétales, à des doses représentatives des conditions d'utilisation de la molécule mère, des effets de la MDPC inférieurs à 50% de ceux de la chloridazone ont été observés^{16,17}.

Le CES « Eaux » considère que le métabolite MDPC n'est pas à classer comme pertinent au titre de cette étape.

L'évaluation de la pertinence pour les EDCH du métabolite est donc poursuivie.

Examen du potentiel génotoxique

Les données réglementaires disponibles, extraites à partir de la monographie européenne du DAR (annexe B du volume B-6), ont été résumées dans le tableau 2.

¹⁵ EFSA. (2007). « Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chloridazon. » *EFSA Scientific Report*. 108, 1-82.

¹⁶ DAR Chloridazon. Annex B. (2004a). «Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany » Chloridazon_DAR_09_Vol 3_B6.pdf

DAR Chloridazon. Annex B. (2004b). «Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. » Chloridazon_DAR_12_Vol 3_B9.pdf

¹⁷ Règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006

¹⁸ Chloridazon – Summary of classification and Labelling - Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) N° 1272/2008 : <https://www.echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/60583>

Type d'essai	Système cellulaire	Doses testées	Résultat de l'étude	Ligne directrice
Test d'Ames	TA 98, TA 100, TA 1535, TA1537, et <i>E. coli</i> WP2 uvrA	20 à 5 000 µg/boîte avec ou sans activation métabolique	négatif	OCDE 471
Test de mutation génique sur cellules de mammifère <i>in vitro</i> (Test HPRT)	Cellules CHO V79	0; 50; 100; 200; 400; 800 et 1 600 µg/mL	négatif	OCDE 476
Essai de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des hépatocytes de mammifères <i>in vitro</i>	Hépatocytes primaires de rats Wistar	1 ^{er} : 0; 31,25; 62,5; 125 ; 250 2 nd : 0; 25; 50; 100 ; 200 3 ^e : 0; 37,5; 75; 150 ; 300 µg/mL	négatif	OCDE 482 ¹⁹
Test d'aberration chromosomique sur cellules de mammifère <i>in vivo</i>	Cellules de moelle osseuse de rats Wistar mâles	Administration orale : 250, 500 et 1 000 mg / kg	négatif	OCDE 475

Tableau 2 : Essais de génotoxicité du métabolite méthyl-desphényl-chloridazone

❖ Test d'Ames

La mutagenèse du MDPC a été évaluée en utilisant le test d'Ames selon la ligne directrice 471 de l'OCDE (étude qualifiée de conforme aux recommandations de la méthode B 1 et B14 3 de la Directive EEC 92/69) effectué sous bonnes pratiques de laboratoire (BPL) en utilisant les souches de *Salmonella* Typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 et *E. coli* WP2 uvrA.

Les essais ont été réalisés en présence et en l'absence d'un système exogène d'activation métabolique exogène (S9 de foie de rat Sprague-Dawley induit par de l'Aroclor 1254) en utilisant la gamme de doses allant de 20 à 5 000 µg/boîte (lot numéro : 01196-259 ; pureté 99,7%), correspondant à la dose maximale recommandée par la ligne directrice de l'OCDE. Des contrôles analytiques des solutions de traitement ont été effectués. Les nombres de colonies dans les témoins négatifs et positifs sont conformes aux données historiques, quelle que soit la souche testée.

Aucune augmentation du nombre de colonies révertantes n'ayant été observée, l'« EFSA journal » et le DAR (annexe B du volume B-6), considèrent que MDPC n'est pas mutagène dans ces conditions expérimentales.

Comme évoqué précédemment pour le métabolite DPC de la chloridazone, le CES « Eaux » estime que le choix du système exogène d'activation S9 dans ce test est discutable car il ne permet pas de mettre en évidence la génotoxicité des amines hétérocycliques.

❖ Test de mutation génique sur cellules de mammifère *in vitro*

L'induction de mutation au locus HPRT vis-à-vis des cellules ovariennes de Hamster Chinois (CHO) selon la ligne directrice de l'OCDE 476 a également été investiguée *in vitro* sous BPL. Deux expériences indépendantes ont été réalisées, en utilisant deux cultures parallèles chacune avec ou

¹⁹ Suite à la décision du Conseil de l'OCDE, l'essai 482 "Toxicologie Génétique : Lésion et Réparation d'ADN - Synthèse Non Programmée de l'ADN (UDS) sur Cellules de Mammifère - *in vitro*" a été supprimé le 2 avril 2014.

sans addition de mélange S9 de foie de rat Sprague-Dawley induit par de l'Aroclor 1254. Les doses suivantes ont été évaluées après une période d'exposition de 4 heures : 0; 50; 100; 200; 400; 800 et 1 600 µg/mL. La période de fixation était de 20 à 24 heures, la période de traitement de 4 heures, une phase d'expression d'environ 7 à 9 jours et une période de sélection d'environ 1 semaine. Des contrôles négatifs et deux contrôles positifs appropriés, le méthylcholanthrène (avec mélange S9) et l'éthylméthane sulfonate (sans mélange S9) ont été évalués. Ces derniers ont entraîné l'augmentation attendue de la fréquence des mutations directes.

La MDPC n'a provoqué aucune augmentation des fréquences mutantes, avec ou sans S9, dans les deux principales expériences réalisées indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, dans les conditions expérimentales décrites, il est conclu dans le DAR (annexe B du volume B-6) et l' « EFSA journal » que la MDPC n'a pas induit de mutation génique au locus HPRT dans les cellules V79 de hamster.

❖ Essai de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des hépatocytes de mammifères *in vitro*

La capacité à induire une synthèse de réparation de l'ADN (synthèse non programmée d'ADN aussi appelé test « UDS ») a été étudiée dans des hépatocytes primaires de rat Wistar *in vitro*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et 100 cellules / groupe de doses ont été quantifiées. Les doses ont été évaluées dans la 1^{ère} expérience : 0; 31,25 ; 62,5; 125 et 250 µg/mL. Cependant, les valeurs des dénombrements de grains nucléaires (NG) et de grains cytoplasmiques (CG) moyens dans tous les groupes d'essai, y compris les groupes témoins négatifs (non traités et témoins de solvant), ont dépassé les données de référence pour des raisons inconnues. Elles n'ont pas été prises en considération pour une conclusion finale.

Une 2^e et une 3^e expérience ont été réalisées avec respectivement les doses : 0; 25; 50; 100 et 200 µg/mL et 0; 37,5; 75; 150 et 300 µg/mL. Une cytotoxicité a été observée à partir de 250 µg/mL environ. Les témoins négatifs et positifs ont confirmé la validité de l'essai.

La MDPC n'ayant pas entraîné d'augmentation du nombre net moyen de grains nucléaires²⁰ (NGN) à quelque niveau de dose que ce soit, le test UDS *in vitro* utilisant des hépatocytes primaires de rat est considéré comme négatif.

Cependant, les résultats présentés dans le DAR (annexe B du volume B-6) ne sont pas détaillés mais seulement résumés et le Conseil de l'OCDE a supprimé cet essai depuis le 2 avril 2014.

❖ Test d'aberration chromosomique sur cellules de mammifère *in vivo*

Le potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vivo* a été étudié chez le rat mâle Wistar après administration unique par voie orale. L'étude, qualifiée d'acceptable aux recommandations de la méthode B 11 de la Directive EEC 92/69 (OCDE 475), a été réalisée sous BPL. La MDPC (lot numéro 1520-061, pureté 99,7 %) a été formulée dans une solution aqueuse de carboxyméthylcellulose à 0,5 % et administrée en dose unique aux doses théoriques de 0, 250, 500 et 1 000 mg/kg pc dans un volume de 10mL/kg p.c. Un groupe contrôle positif (cyclophosphamide) a été réalisé. Des groupes d'animaux ont été sacrifiés à 20 heures (3 doses) et 44 heures (dose maximale uniquement) après le traitement unique et la moelle osseuse (MO) a été récoltée. Les contrôles positifs et négatifs ont confirmé la validité de l'essai.

L'administration de la MDPC jusqu'à 1 000 mg/kg p.c. a été tolérée par tous les animaux sans aucun signe ni symptôme. Le taux de métaphases aberrantes était toujours dans la même plage que celui du contrôle négatif dans tous les groupes après 20 et 44 h. Dans ces conditions expérimentales, le

²⁰ Nombre net moyen de grains nucléaires (NGN) : mesure quantitative de la synthèse non programmée de l'ADN dans les cellules par autoradiographie, calculée en déduisant le nombre moyen de grains cytoplasmiques (GC) dans les zones cytoplasmiques équivalant au noyau du nombre de grains nucléaires (NG), donc $NGN = GN - GC$. Le NGN est d'abord calculé pour des cellules individuelles, puis totalisé pour toute une culture, dans des cultures parallèles, etc.

DAR (annexe B du volume B-6) et « l'EFSA journal » concluent que la MDPC n'a pas induit d'effet clastogène dans les cellules de moelle osseuse des rats Wistar *in vivo*.

Même s'il n'est pas possible d'analyser précisément les protocoles utilisés pour ces études de génotoxicité, le CES « Eaux » note que seulement 100 métaphases furent analysées au lieu des 200 recommandées par la ligne directrice OCDE 475, révisée en 2016. Par ailleurs, en l'absence de dosage sanguin, il n'est *a priori* pas possible de s'assurer que la MO des animaux traités ait été réellement exposée ce qui pourrait remettre en question la pertinence des résultats négatifs.

En complément, un test d'aberration chromosomique mené *in vitro* aurait permis d'appuyer les résultats négatifs *in vivo*.

❖ Données complémentaires

Comme pour le métabolite DPC, le CES « Eaux » a examiné les autres données de toxicologie disponibles dans le DAR (annexe B du volume B-6). Parmi ces données, le CES « Eaux » souligne une étude de toxicité subchronique sur 90 jours réalisée en 2001 chez le rat Wistar, par voie orale et aux doses de 2, 10, et 50 mg/kg p.c/j. Cette étude n'ayant pas montré d'effet considéré comme indésirable y compris à la plus forte dose testée, le CES « Eaux » considère la plus forte dose testée comme relativement faible et inadéquate notamment eu égard aux nombreux effets vésicaux et rénaux du métabolite DPC, mentionnés précédemment et observés à des doses supérieures (270 – 310 mg/kg p.c/j), constituant un signal d'alerte vis-à-vis d'un potentiel cancérigène.

Ainsi, considérant :

- le choix du système d'activation métabolique de rat et non de hamster qui aurait été plus judicieux pour le test d'Ames en raison de la structure chimique (amine hétérocyclique) du métabolite,
- des déviations par rapport à la ligne directrice actuelle du test d'aberration chromosomique *in vivo*,
- l'absence de test d'aberration chromosomique *in vitro*,
- les faibles doses testées dans l'étude de toxicité subchronique de 90 jours,
- la recherche bibliographique réalisée en complément qui n'a pas apporté d'élément complémentaire pertinent,

le CES « Eaux », après avis de ses rapporteurs, considère qu'il n'est pas possible de conclure sur les potentiels mutagène ou génotoxique de la MDPC.

3.2.3. Conclusion du CES « Eaux » sur la pertinence du métabolite méthyl-desphényl-chloridazone

Sur la base des données des monographies européennes et de la recherche bibliographique réalisée en complément, et selon le schéma décisionnel de détermination de la pertinence dans les EDCH, considérant les doutes et manquements soulevés lors de l'examen des études réalisées pour l'évaluation de son potentiel génotoxique, **le métabolite méthyl-desphényl-chloridazone est considéré comme un métabolite « pertinent pour les EDCH ».**

4. CONCLUSION DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du GT ERS EDCH II et du CES « Eaux ».

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Pesticides, métabolite, pertinence, eau de boisson, désphényl-chloridazone, méthyl-desphényl-chloridazone.

Pesticides, metabolite, relevant, drinking-water, chloridazon-desphenyl, chloridazon-desphenyl-methyl.

BIBLIOGRAPHIE

Publications

Anses. (2019). Avis de l'Anses du 30 janvier 2019 relatif à l'évaluation de la pertinence des métabolites de pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine.

DAR Chloridazon. Annex B. (2004a). "Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany » Chloridazon_DAR_09_Vol 3_B6.pdf

DAR Chloridazon. Annex B. (2004b). "Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. » Chloridazon_DAR_12_Vol 3_B9.pdf

EFSA. (2007). « Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chloridazon. » *EFSA Scientific Report*. 108, 1-82.

Fassina G., Abbondandolo A., Mariani L., Taningher M., Parodi S. (1990). *Mutagenicity in V79 cells does not correlate with carcinogenicity in small rodents for 12 aromatic amines*. *J. toxicol. environm. health*. 29. 109-30.

Hakura A., Shimada H., Nakajima M., Sui H., Kitamoto S., Suzuki S., Satoh T. (2005) *Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds*. *Mutagenesis*, Vol. 20, Issue 3, Pages 217–228.

Levy D., Zeiger E., Escobar P., Hakura A., Leede B.J., Kato M., Moore M., Sugiyama KI. (2019). *Recommended Criteria for the Evaluation of Bacterial Mutagenicity Data (Ames Test)*. *Mut. Res./Genetic Toxicol. Environm. Mutagenesis*. Vol 848, 403074.

OCDE 471. (1997). Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essai de mutation réverse sur des bactéries. : Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

OCDE 473. (2016). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères. : Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

OCDE 475. (2016). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères : Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

OCDE 476. (2016). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essai *in vitro* de mutation génique sur des cellules de mammifères : Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

OCDE 482. (1986). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Toxicologie Génétique : Lésion et Réparation d'ADN – Synthèse Non Programmée de l'ADN (UDS) sur Cellules de Mammifère – *in vitro*. – supprimées le 2 avril 2014.

Sadrieh N., Davis CD., Snyderwine EG., (1996). *N-Acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived Heterocyclic amines in the Human mammary gland*. Cancer Res. Vol 56. Pages 2683-2687.

Wild D., Feser W., Michel S., Lord HL., Josephy PD. (1995). *Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine N-acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in Salmonella typhimurium*. Carcinogenesis. 16(3):643-8.

Législation et réglementation

Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal officiel des Communautés européennes. L330 du 5 décembre 1998, p32-54.

Règlement d'exécution (UE) n°540/2011 de la commission du 25 mai 2011 portant application du règlement (CE) n°1107/2009 du Parlement européen et du Conseil, en ce qui concerne la liste des substances actives approuvées.

<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:153:0001:0186:FR:PDF>

Règlement (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006.

<https://www.echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/60583>

ANNEXE 1 – SCHEMA DECISIONNEL DE LA PERTINENCE DES METABOLITES DE PESTICIDES POUR LES EDCH

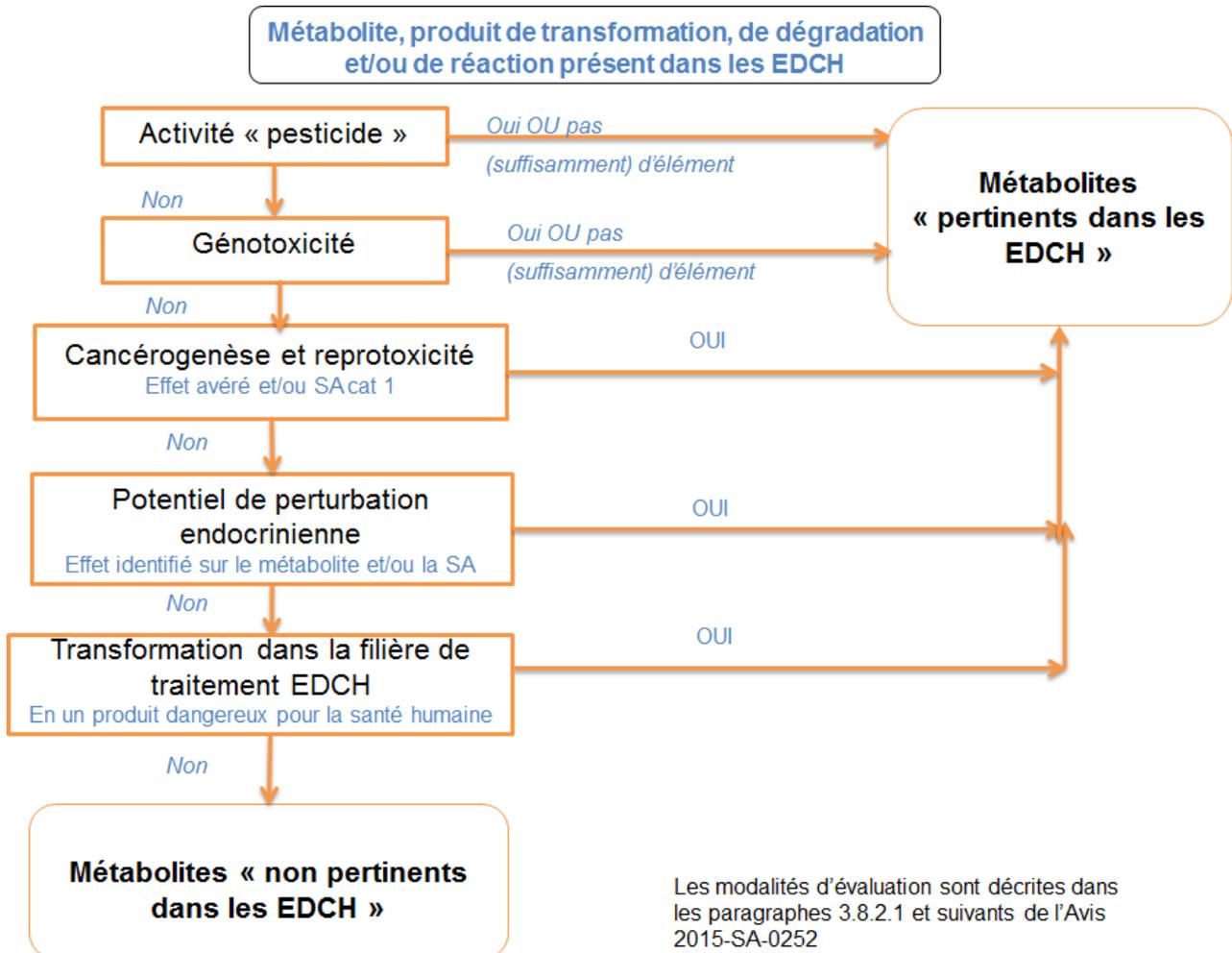


Figure 3 : Schéma décisionnel de la pertinence des métabolites de pesticides pour les EDCH (d'après l'avis de l'Anses 2015-SA-0252 du 30 janvier 2019).

ANNEXE 2

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.

RAPPORTEURS

M. Jean-Ulrich MULLOT - Pharmacien en chef, Service de santé des armées. Ministère de la Défense.

M. Fabrice NESSLANY - Chef du service de toxicologie - Institut Pasteur de Lille.

Mme Camille SAVARY - Maître de conférence - Université d'Angers.

GROUPE DE TRAVAIL « ERS EDCH 2 »

Président

M. Yves LÉVI - Professeur, Université Paris Sud - Santé publique et environnementale, qualité des eaux

Membres

M. Edmond CREPPY - Professeur, Université de Bordeaux

M. Fabrice DASSONVILLE - Ingénieur du génie sanitaire, ARS PACA

M. Joseph DE LAAT - Professeur, Université de Poitiers

Mme Laetitia KNOCKAERT - Référente pharmacie, Collège des Hautes Études en Médecine

M. Patrick LEVALLOIS - Médecin spécialiste, Institut national de santé publique du Québec

M. Benjamin LOPEZ - Chef de projet, BRGM

M. Jean-Michel MAIXENT - Professeur, Université de Poitiers

M. Daniel PERDIZ - Maître de conférences, Université Paris Sud

M. Christophe ROSIN - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, Anses

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT - Professeur, Université Clermont Auvergne

Mme Bénédicte WELTÉ - Retraitée

PARTICIPATION ANSES

Direction de l'évaluation des risques

Mme Eléonore NEY - Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

M. Nicolas FARION - Unité d'évaluation des risques liés à l'eau

Mme Virginie SADÉ - Assistante secrétariat

Direction d'évaluation des produits réglementés

Mme Adeline CAVELIER

Mme Emilie FARAMA

Mme Farida OUADI