

LE DIRECTEUR GENERAL

Maisons-Alfort, le 4 décembre 2014

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

**relatif « à la pertinence de deux études ayant contribué à la modification du
classement harmonisé de la substance époxiconazole »**

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 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 rendus publics.

L'Anses a été saisie le 8 septembre 2014 par la Direction générale de la Santé (DGS) d'une demande d'avis relatif à la pertinence deux études ayant contribué à la modification du classement harmonisé de la substance époxiconazole.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le 16 mai 2013, les autorités françaises ont transmis à la Commission européenne une liste de 21 substances actives déjà autorisées et suspectées de ne pas répondre aux critères d'approbation prévus par le règlement (CE) n°1107/2009 relatif à la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. Ce courrier appelait l'attention des instances européennes sur la nécessité de procéder à une réévaluation rapide de ces substances et, dans l'attente de celle-ci, de les inscrire dans la liste des substances candidates à la substitution. Parmi ces substances citées figure l'époxiconazole pour laquelle les nouvelles autorisations de mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques ont été suspendues.

L'époxiconazole a été classé par l'annexe II du règlement (UE) n°944/2013, qui modifie le règlement (CE) n°1272/2008, comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B. De facto, cette nouvelle classification a pour effet d'intégrer cette substance parmi celles candidates à l'exclusion au regard des dispositions prévus par l'article 4 du règlement (CE) n°1107/2009. Cependant, les substances actives approuvées avant le 14 juin 2011 (à l'instar de l'époxiconazole autorisé en 2009) restent autorisées jusqu'à leur réexamen, et ce en dépit de leur non-conformité aux dispositions de l'article 4 du règlement.

Le recours à l'article 44 du règlement (CE) n°1107/2009 relatif à la mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques permet toutefois à un Etat membre de retirer ou modifier une autorisation de produit phytopharmaceutique si de nouveaux éléments scientifiques démontrent un risque grave pour la santé humaine. L'article 44 peut être utilisé, par exemple, si des éléments scientifiques permettent de démontrer qu'un produit phytopharmaceutique a un effet nocif, même différé, sur la santé humaine.

L'Anses a été saisie « afin de déterminer si les deux études (Taxvig, 2007 et 2008) qui ont justifié le reclassement de l'époxiconazole peuvent constituer des éléments nouveaux suffisants pour servir de base à la mise en œuvre de certaines mesures de sauvegarde auprès de la Commission européenne ».

L'Anses rappelle, en préambule, que le classement de l'époxiconazole en substance reprotoxique de catégorie 1B n'est pas seulement fondé sur les résultats de ces deux études. L'ensemble des données disponibles évaluées par le RAC (Committee for Risk Assessment de l'ECHA¹) a conduit à cette classification sur la base de l'observation de deux effets néfastes principaux 1) des pertes post-implantatoires et des résorptions tardives et 2) l'augmentation de l'incidence des fentes palatines (RAC opinion, 2012).

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 a été réalisée par l'unité d'évaluation toxicologie des produits réglementés de la Direction des produits réglementés de l'Anses et le Comité d'experts spécialisé "Produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques" a été consulté le 30 octobre 2014.

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 rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE

3.1. Aspect réglementaire et valeurs toxicologiques de référence de l'époxiconazole

La substance active époxiconazole a été inscrite le 1^{er} mai 2009 à l'Annexe I de la Directive 91/414/CEE², qui a précédé son approbation au titre du Règlement (CE) n° 1107/2009³. Cette inscription est fondée sur les conclusions de l'EFSA (EFSA, 2008) après évaluation par les pairs du rapport d'évaluation préparé par l'Allemagne, Etat Membre Rapporteur.

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) retenues dans le cadre de l'évaluation européenne (EFSA, 2008) sont les suivantes :

¹ ECHA European Chemical Agency

² DIRECTIVE 2008/107/CE DE LA COMMISSION du 25 novembre 2008 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil afin d'y inscrire les substances actives abamectine, époxiconazole, fenpropimorph, fenpyroximate et tralkoxydime.

³ 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.

- La DJA⁴ est de 0,008 mg/kg p.c.⁵/j. Elle a été déterminée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet néfaste observé de 0,8 mg/kg pc/j obtenue dans une étude de toxicité par voie orale de 18 mois chez la souris.
- L'AOEL⁶ est de 0,008 mg/kg pc/j. Il a été déterminé en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet néfaste observé de 1,6 mg/kg pc/j obtenue dans une étude de toxicité par voie orale de un an chez le chien et en considérant un facteur d'absorption orale de 50%.
- L'ARfD⁷ est de 0,023 mg/kg pc/j. Elle a été déterminée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet néfaste observé de 2,3 mg/kg pc/j obtenue dans une étude de toxicité sur la reproduction (2 générations) chez le rat.

3.2. Classification toxicologique

La classification toxicologique harmonisée de l'époxiconazole, figurant dans le Règlement (UE) n° 944/2013⁸, est cancérogène de catégorie 2 H351 (Susceptible de provoquer le cancer) et toxique pour la reproduction de catégorie 1B H360Df (Peut nuire au fœtus. Susceptible de nuire à la fertilité). Selon l'ancienne Directive 67/548/CEE abrogée par le Règlement (CE) n° 1272/2008, l'époxiconazole est classé cancérogène de catégorie 3 R40 (Effet cancérogène suspecté – preuves insuffisantes), toxique pour la reproduction de catégorie 2 R61 (Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant) et de catégorie 3 R62 (Risque possible d'altération de la fertilité).

Historique concernant la classification pour le développement de l'époxiconazole

En 2001, la classification pour le développement de l'époxiconazole incluse dans la 28^{ème} adaptation au progrès technique de la Directive 67/548/CEE était Repr. Cat. 2 R61 (Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant). Cette classification avait été retenue par l'ECB (European Chemicals Bureau), l'organisme en charge à cette époque des classifications harmonisées des substances.

Après une révision par l'ECB, la classification figurant dans la 29^{ème} adaptation au progrès technique de la Directive 67/548/CEE en 2004 était Repr. Cat. 3 R63 (Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant).

En 2007, deux nouvelles publications ont été transmises par la Suède (Taxvig, 2007 et Birkhog Kjaerstad, 2007) à l'ECB. Les Etats Membres participant au groupe de travail de l'ECB n'ont cependant pas jugé nécessaire la réouverture des discussions concernant la classification pour le développement de l'époxiconazole.

En 2009, la Suède a soumis une nouvelle proposition de classification à l'ECHA (European Chemicals Agency), organisme actuellement en charge de l'instruction des travaux relatifs à la classification harmonisée des substances. Cette nouvelle proposition en faveur d'un classement en substance reprotoxique cat. 1B selon la terminologie du Règlement (CE) n° 1272/2008 s'appuyait notamment sur les résultats des deux publications citées ci-dessus. Lors de la mise en commentaires de cette proposition, une publication supplémentaire (Taxvig, 2008) a été identifiée et incluse dans le dossier.

⁴ Dose Journalière Admissible.

⁵ p.c. : poids corporel

⁶ Niveau acceptable d'exposition pour l'opérateur.

⁷ Dose de Référence Aiguë.

⁸ RÈGLEMENT (UE) n° 944/2013 DE LA COMMISSION du 2 octobre 2013 modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique et scientifique, le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

Sur la base de cette nouvelle proposition de classification mais également sur les résultats de nouvelles études qui n'étaient pas disponibles, ni lors de l'examen de la substance active par l'ECB, ni lors de son évaluation dans le cadre de son inscription à l'Annexe I de la Directive 91/414/CEE, le RAC (Committee for Risk Assessment) a conclu en 2012 que l'époxiconazole pouvait entraîner un risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant, conduisant à un classement de la substance comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B. Ce classement a été inclus dans le Règlement (UE) n° 944/2013 (5^{ème} adaptation au progrès technique du Règlement (UE) No 1272/2008).

3.3. Présentation des études de Taxvig et al.

Il s'agit d'études de toxicité pour le développement intégrant un suivi spécifique des paramètres relatifs aux fonctions endocriniennes, et qui ont été réalisées chez le rat Wistar.

L'étude de Taxvig et al. 2007 est composée de deux phases :

- ✓ une première phase dans laquelle les femelles sont exposées du 7^{ème} jour de gestation au 16^{ème} jour de lactation à 0,15 et 50 mg/kg pc/j d'époxiconazole, qui explore le développement pré- et périnatal ;
- ✓ une seconde phase dans laquelle les femelles gravides sont exposées du 7^{ème} au 21^{ème} jour de gestation (GD 7-21) à 0,15 et 50 mg/kg pc/j d'époxiconazole. A GD21, les mères subissent une césarienne.

L'étude de Taxvig et al., 2008 est également séparée en deux phases :

- ✓ une phase qui est une répétition de la deuxième phase de l'étude de Taxvig et al. 2007 mais dans laquelle seules les doses de 0 et 50 mg/kg pc/j d'époxiconazole ont été testées ;
- ✓ une seconde phase consistant en un test de Hershberger⁹ réalisé chez des rats mâles castrés.

Analyse des protocoles

Le protocole suivi dévie de celui de la ligne directrice OCDE 414¹⁰ notamment par un nombre insuffisant de doses testées et d'animaux alloués à chaque dose testée. Les études n'ont pas été réalisées dans le cadre des Bonnes Pratiques de Laboratoire et les données brutes ne sont pas disponibles dans les publications.

Cependant, la pureté du matériel testé est indiquée, le protocole mis en œuvre est bien détaillé et une analyse statistique des résultats a été réalisée. Ces études permettent en outre d'explorer une fenêtre d'exposition plus large (GD 7-21 jours versus GD6-15 préconisée dans la ligne directrice OCDE) et d'étudier des paramètres, comme la distance ano-génitale des fœtus ou des nouveaux nés, qui n'ont pas été étudiés dans les études dont l'évaluation est présentée dans le projet de monographie européenne. Le test de Hershberger⁹ suit les principales exigences de la ligne directrice OCDE 441; cependant les critères de performance requis dans la ligne directrice ne sont pas renseignés.

Ces études ont été considérées comme acceptables par le RAC lors de la révision de la classification de l'époxiconazole entre 2010 et 2012.

Résultats (effets observés)

Trois effets principaux ont été rapportés.

Augmentation des pertes post-implantatoires :

Une augmentation statiquement significative à 50 mg/kg p.c./j. des pertes post-implantatoires, notamment des résorptions très tardives, est observée chez les femelles exposées de GD7 à GD21 dans les deux études.

⁹ OCDE 441 : Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques Bio-essai de Hershberger sur le rat. *Essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques*.

¹⁰ OCDE 414 : Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Étude de la toxicité pour le développement prénatal.

Des pertes post-implantatoires sont également observées dans les études de toxicité pour le développement analysées dans la monographie, notamment dans une étude dans laquelle les femelles gravides ont été exposées à 180 mg/kg p.c./j. de GD6 à GD19 (Allemagne, 2005). De plus, une augmentation du nombre de morts-nés est rapportée dans les deux générations de l'étude de toxicité sur la reproduction à la dose de 23 mg/kg p.c./j. (Allemagne, 2005). Ces deux études permettent de confirmer une mortalité embryo-fœtale tardive déjà observée à une dose inférieure dans l'étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations qui est présentée dans le projet de monographie européenne.

Augmentation de la distance ano-génitale :

Une augmentation statistiquement significative de la distance ano-génitale ainsi que de la distance ano-génitale pondérée par la racine cubique du poids est observée chez les nouveaux nés femelles à 15 mg/kg p.c./j. et chez les fœtus femelles à 15 et 50 mg/kg p.c./j. dans l'étude de Taxvig *et al.* de 2007, dans les 1^{ère} et 2^{ème} phases, respectivement. Cependant, cet effet n'est pas observé dans l'étude de Taxvig *et al.* de 2008 et par ailleurs, les valeurs des contrôles négatifs de cette étude sont plus élevées que celles observées chez les animaux traités dans l'étude de 2007.

En l'absence de contrôles historiques et au regard de la disparité des valeurs des témoins des deux études, il est difficile de conclure sur la significativité de cet effet. Par ailleurs, les autres paramètres étudiés marqueurs de perturbation endocrinienne (comptage des mamelons, qualité spermatique...) n'ont pas été modifiés. De plus, le test de Hershberger n'a pas mis en évidence d'effets androgéniques ou antiandrogéniques.

Déséquilibres hormonaux chez les mères :

Chez les femelles gestantes à GD21 exposées à 50 mg/kg p.c./j., il est observé :

- ✓ une augmentation statistiquement significative de la testostérone dans les deux études ;
- ✓ une augmentation statistiquement significative de la progestérone dans l'étude de Taxvig *et al.* de 2007 non observée dans l'étude de 2008 ;
- ✓ une diminution statistiquement significative de l'œstradiol dans l'étude de 2008 (paramètre non mesuré dans l'étude de 2007).

Un déséquilibre des hormones stéroïdiennes est également indiqué dans le projet de monographie européenne, notamment dans une étude de toxicité pour le développement et des études de toxicité après une exposition de 4 jours et 28 jours chez le rat (Allemagne DAR, 2005).

Les deux études de Taxvig *et al.* de 2007 et 2008 permettent de mettre en évidence un mode d'action de perturbation de l'homéostasie des hormones stéroïdiennes, notamment par inhibition de l'aromatase. Ce mode d'action était indiqué dans les conclusions de l'EFSA de 2008 sur la base des résultats d'études du projet de monographie (Allemagne DAR, 2005).:

- ✓ études *in vitro* ;
- ✓ dosages hormonaux;
- ✓ effets néfastes observés : augmentation du temps de gestation, dystocies, resorptions très tardives

Conclusion

Les effets mis en évidence par les deux études de Taxvig *et al.* de 2007 et 2008 avaient déjà été identifiés dans les études disponibles lors de l'évaluation européenne coordonnée par l'EFSA. Les deux nouvelles études confirment néanmoins le caractère perturbateur endocrinien de l'époxiconazole.

3.4. Autres études disponibles

Il convient de noter qu'au-delà des deux études citées dans la saisine, de nouvelles études ont été finalisées postérieurement à l'évaluation européenne coordonnée par l'EFSA.

Ces études ont été conduites par différentes équipes. Les études jugées les plus pertinentes ainsi que les effets marquants rapportés sont présentés ci-après :

- Quatre publications relatent les travaux réalisés sur des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* par la même équipe (Department of Toxicology and Risk Assessment, National Food Institute, Technical University of Denmark).

Outre des données *in vitro* portant sur les mécanismes de régulation endocrinienne (effets anti-androgénique, anti-oestrogénique, anti-aromatase, altération de la synthèse stéroïdienne), ces travaux portent sur les effets observés sur la reproduction et les altérations neuro-comportementales chez le rat suite à une exposition pré- et périnatale à différentes substances phytopharmaceutiques (dont l'époxiconazole) séparément ou en mélange. Les protocoles mis en œuvre ont pour but d'évaluer l'effet des mélanges, mais les résultats permettent également de confirmer l'embryotoxicité de l'époxiconazole.

Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Nellemann, C., et al. (2010). Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology* 30, 573-582.

Dreisig, K., Taxvig, C., et al. (2013). Document Predictive value of cell assays for developmental toxicity and embryotoxicity of conazole fungicides. *Altex* 30 (3), 319-330.

Jacobsen, P.R., Axelstad, M., et al. (2012). Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology* 34 (2), 237-250.

Hass, U., Boberg, J., et al. (2012). Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reproductive Toxicology* 34 (2), 261-274.

- Une publication relatant des travaux réalisés par le BfR¹¹ sur un modèle *in vitro* de cellules placentaires humaines met en évidence une diminution de la production de progestérone suite à une exposition à l'époxiconazole. Ce résultat montre qu'un mécanisme de régulation de la fonction endocrinienne autre que l'inhibition de l'aromatase pourrait être pertinent chez l'homme.

Rieke, S., Koehn, S., et al. (2014). Combination Effects of (Tri) Azole Fungicides on Hormone Production and Xenobiotic Metabolism in a Human Placental Cell Line. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 9660-9679.

- Les travaux de l'équipe de Menegola (Università degli studi di Milano, Dipartimento di Biologia, Milano, Italy) ont pour but d'explorer le mécanisme de tératogénicité à l'origine des fentes palatines observées dans les études de toxicité pour le développement de fongicides azolés. Le mode d'action mis en évidence implique une inhibition du cytochrome P26 embryonnaire qui contrôle la concentration en acide rétinoïque.

¹¹ BfR : Institut fédéral d'évaluation des risques allemand.

Menegola E., Broccia M.L., et al. (2006). Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects, *Reproductive Toxicology* 22 (2), 186-195.

Menegola E., Di Renzo F., et al. (2009) Cleft palate and exposure to an azole derivative: Triadimefon, *Reproductive Toxicology* 28(2), 123.

Giovini, E., Menegola, E. (2010). Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicology Letters* 198, 106-111.

Menegola, E., Di Renzo, F., et al. (2013). Effects of mixtures of azole fungicides in post-implantation rat whole-embryo cultures *Arch Toxicol* 87 (11) pp 1989-1997.

- Les études fournies par la société BASF et évaluées par le RAC en 2012 ainsi que des publications intégrées dans l'évaluation du RAC. L'analyse de ces éléments suggère qu'une inhibition de l'aromatase est à l'origine des pertes post-implantatoires observées chez le rat. Le RAC conclut que l'extrapolation du mécanisme d'action à l'homme ne peut être exclue. Le RAC a confirmé également que la forte incidence de fentes palatines observée chez le rat justifie un classement toxique pour la reproduction de catégorie 1B.

RAC (Committee for risk assessment) opinion 2012, opinion proposing harmonized classification and labelling at EU level on toxicity on toxicity to reproduction of epoxiconazole, **ECHA/RAC/A77-O-0000001412-86-08/F**, 28 November 2012.

Schneider, S., Hofmann, T., et al. (2013). Species differences in developmental toxicity of epoxiconazole and its relevance to humans. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* 98 (3), 230-246.

Schneider, S., Fegert, I., et al. (2013). Effects of estrogen coadministration on epoxiconazole toxicity in rats. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* 98 (3), 247-259.

Rey Moreno, M.C., Fussel, K.C., et al. (2013). Epoxiconazole-induced degeneration in rat placenta and the effects of estradiol supplementation. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* 98 (3), 208-221.

Ces études méritent d'être également prises en compte dans la réévaluation de l'époxiconazole.

4. CONCLUSION

La substance époxiconazole a été classée par l'annexe II du règlement (UE) n°944/2013, qui modifie le règlement (CE) n°1272/2008, comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B.

L'Anses a été saisie afin de déterminer si deux études (Taxvig, 2007 et 2008), évaluées par l'ECHA dans le cadre de cette procédure de classification, peuvent constituer des éléments nouveaux suffisants pour servir de base à la mise en œuvre de certaines mesures de sauvegarde auprès de la Commission européenne.

Les études de Taxvig *et al.* de 2007 et 2008 mettent en évidence des effets qui ont déjà été identifiés dans les études disponibles lors de l'évaluation européenne coordonnée par l'EFSA. Elles confirment des effets déjà observés qui mettent en évidence un mode d'action de toxicité ayant notamment des effets sur le système endocrinien.

Toutefois, il convient de noter qu'au-delà des deux études mentionnées, d'autres nouvelles études ont été finalisées postérieurement à l'évaluation européenne coordonnée par l'EFSA (EFSA Scientific Report, 2008). Compte tenu de la convergence des effets rapportés, il semble pertinent que ces nouveaux éléments soient analysés sans délai par l'Etat membre rapporteur afin d'actualiser l'évaluation de la substance et d'identifier s'ils sont de nature à remettre en question l'évaluation des risques.

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Epiconazole, nouveau classement

BIBLIOGRAPHIE

Allemagne (2005) Epoxiconazole, Draft Assessment Report and Proposed Decision of Germany prepared in the context of the possible inclusion of epoxiconazole in Annex I of Council Directive 91/414/EEC. Volume 3, Annex B.6, Toxicology and metabolism.

Birkhog Kjaerstad M., et al. **2007** Effects of azole fungicides on the function of sex and thyroid hormones, Danish Ministry of the Environment (Environmental Protection Agency), Pesticides Research No.111 -1843.

EFSA Scientific Report, **2008** Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment epoxiconazole. *EFSA Journal*, 138, 1-80.
<http://www.efsa.europa.eu/fr/efsjournal/doc/138r.pdf>

RAC (Committee for risk assessment) opinion 2012, opinion proposing harmonized classification and labelling at EU level on toxicity on reproduction of epoxiconazole, **ECHA/RAC/A77-O-000001412-86-08/F**, 28 November 2012.

Taxvig C, Vinggaard AM, Hass U, Axelstad M, Metzdorff S, Nellemann C. **2008** Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides *Int J Androl.* 31(2):170-7.

Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen HR, Vinggaard AM. **2007** Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 100(2):464-73.