

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 04 mai 2023

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

**relatif au réexamen du classement de la pertinence pour le métabolite
desphényl-chloridazone dans les eaux destinées à la consommation humaine**

*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 le 6 septembre 2022 par la Direction générale de la santé (DGS) pour réexaminer le classement de la pertinence pour les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) du métabolite desphényl-chloridazone (DPC).

1. CONTEXTE RÉGLEMENTAIRE ET OBJET DE LA SAISINE

Pour garantir la qualité des EDCH, la directive 2020/2184, transposée en droit français, fixe des valeurs paramétriques pour les concentrations en pesticides et leurs métabolites pertinents ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ par substance individuelle¹ et $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des pesticides et de leurs métabolites), sans définir les critères ou les modalités d'évaluation de cette pertinence. L'arrêté du 11 janvier 2007 modifié reprend ces valeurs comme limites de qualité (LQ) dans les EDCH pour les pesticides et leurs métabolites pertinents.

À la demande de la DGS, l'Anses a proposé en janvier 2019 (Anses 2019) une méthodologie pour évaluer, au vu des connaissances scientifiques disponibles, les métabolites de pesticides au regard de la pertinence ainsi définie dans les EDCH. Cette méthodologie peut s'appliquer

¹ À l'exception de l'aldrine, dieldrine, heptachlore et heptachlore époxyde pour lesquels la valeur est de $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$.

à tout métabolite quantifiable dans les EDCH. Elle est destinée à être mise en œuvre dans le cadre d'une expertise collective de l'Anses, en s'appuyant sur les données disponibles (dossiers d'homologation, littérature scientifique...). Sur la base du résultat d'une telle évaluation, et de tout autre élément qu'elle considèrerait approprié, la DGS désigne les métabolites pertinents, c'est-à-dire devant faire l'objet d'une attention particulière (en termes de surveillance, de limite de qualité, ...). En l'absence d'évaluation, un métabolite est considéré pertinent par défaut.

Pour les métabolites non pertinents de pesticides, la directive susmentionnée demande aux États membres d'établir une valeur indicative aux fins de gestion de leur présence dans les EDCH. Ainsi, l'arrêté du 11 janvier 2007 modifié fixe pour ces métabolites une valeur indicative de 0,9 µg.L⁻¹, correspondant à la valeur proposée par l'Anses pour les métabolites classés non pertinents dans son avis du 30 janvier 2019.

À la demande de la DGS, l'Anses avait caractérisé la pertinence du métabolite desphénylchloridazone (DPC) dans son avis du 23 avril 2020 (Anses 2020). Ce métabolite a été proposé « pertinent dans les EDCH » par l'Agence, des doutes subsistant sur son potentiel génotoxique.

Fin juillet 2022, la société BASF², une des sociétés qui a commercialisé des produits à base de la substance active (SA) chloridazone³, a porté à la connaissance de la DGS et de l'Anses deux études complémentaires de génotoxicité réalisées sur le métabolite DPC.

En raison de difficultés persistantes de gestion de l'alimentation en eau potable, liées au classement de la pertinence de ce métabolite pour les EDCH et de l'état de contamination de ces eaux par celui-ci, la DGS a de nouveau saisi l'Anses le 6 septembre 2022 pour réexaminer ce classement au vu des nouvelles études transmises.

En décembre 2022, après examen des données de génotoxicité complémentaires, l'Anses a adressé au pétitionnaire des demandes de précision concernant la méthodologie et l'analyse des résultats pour les deux études qui lui ont été transmises. Le déclarant a apporté des réponses courant janvier 2023. Ces dernières ont été prises en compte dans la présente expertise.

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 le réexamen du caractère « pertinent pour les EDCH » du métabolite DPC de la chloridazone.

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

² Désigné comme « le déclarant » dans la suite de cet avis.

³ En octobre 2019, l'Anses a procédé au retrait de 6 autorisations de mise sur le marché et 1 permis de commerce parallèle pour des produits phytopharmaceutiques à base de chloridazone, dans le cadre de l'expiration de l'approbation de ces substances au 31 décembre 2018. La fin de vente et de distribution a été fixée au 30 juin 2020. La fin d'utilisation des stocks de produits a été fixée au 31 décembre 2020 (<https://ephy.anses.fr/actualites/retrait-du-march%C3%A9-produits-base-chloridazone-imazaquine-quinoclamine>).

humaine » (GT ERS EDCH III). Les travaux ont été présentés au GT lors des réunions des 22 novembre et 21 mars 2023 et validés lors de la réunion du 21 mars 2023.

Les travaux ont été également présentés au CES « Eaux » les 8 novembre et 6 décembre 2022. Le projet d'avis a été adopté par ce CES le 4 avril 2023.

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/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES « EAUX »

La méthode d'évaluation de la pertinence des métabolites de pesticides pour les EDCH (Annexe 1), détaillée dans l'avis de l'Anses du 30 janvier 2019 (Anses, 2019), a été appliquée au métabolite DPC de la chloridazone.

Les données considérées pour évaluer sa pertinence pour les EDCH sont issues de la documentation rendue disponible dans le cadre de la demande historique d'évaluation de la chloridazone (rapports d'évaluation rédigés par l'État membre rapporteur du dossier d'évaluation, soit le « Rapporteur Member State » ou RMS (Efsa 2004a, 2004b, 2004c) et « *Efsa Journal* » (Efsa 2007)), des études complémentaires de génotoxicité transmises à l'Agence par le déclarant et de la littérature scientifique.

3.1. 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 2018 (Règlement d'exécution (UE) n° 540/2011). Sa dénomination est la 5-amino-4-chloro-3(2H)-pyridazinone et le métabolite est identifié sous le numéro CAS 6339-19-1. Sa structure est présentée en figure 1.

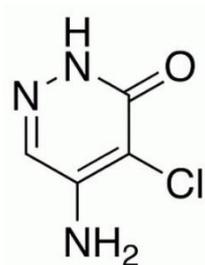


Figure 1 : Structure chimique du métabolite desphényl-chloridazone.

Le CES « Eaux » note que la DPC possède un groupement NH₂ réactif avec le chlore. Des études sont en cours au laboratoire d'hydrologie de Nancy (LHN) de l'Anses pour vérifier la stabilité de la molécule en présence de chlore.

3.2. Évaluation de la pertinence

Comme indiqué dans le chapitre 1 du présent avis, la pertinence du métabolite DPC pour les EDCH a déjà été évaluée en 2020. Les conclusions de l'avis du 23 avril 2020 précité (Anses 2020) sont donc reprises et amendées par celles tirées de l'analyse des nouvelles données rendues disponibles depuis.

Des informations sur l'activité « pesticide » ainsi que des données toxicologiques figurent dans l'« *Efsa Journal* » sous forme de résumés disponibles sur le site de l'Efsa (Efsa 2007) et dans la monographie européenne (annexes B-6 et B-9 du volume 3) datant de 2004 (Efsa 2004a, 2004b, 2004c). Une recherche bibliographique concernant les effets mutagènes, génotoxiques, cancérigènes, la toxicité pour la reproduction et le potentiel de transformation dans les filières de traitement d'EDCH a été réalisée en 2020, puis réactualisée en septembre 2022.

Par ailleurs, la SA parente du métabolite, la chloridazone, est classée de manière harmonisée au titre du règlement CLP (CE) n°1272/2008 mais ne fait pas l'objet d'un classement pour une propriété cancérigène, mutagène ou reprotoxique (CMR)⁴.

3.2.1. Examen de l'activité « pesticide »

► Rappel des conclusions de l'avis du 23 avril 2020 (Anses 2020)

L'« *Efsa Journal* » de 2007 conclut à l'absence d'activité « pesticide » du métabolite 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 (Efsa, 2004c).

Le CES « Eaux » a considéré que 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.

3.2.2. Examen du potentiel génotoxique

L'« *Efsa Journal* » (Efsa 2007) et le « Draft Assessment Report » (DAR) (annexe B-6 du volume 3 (Efsa, 2004b)) 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.

Deux études complémentaires ont été transmises à l'Anses par le déclarant en juillet 2022 : un test d'Ames et un test du micronoyau *in vivo* réalisé sur érythrocytes de mammifères (souris).

L'ensemble des résultats disponibles est présenté dans le tableau 1 ci-dessous (les deux études complémentaires apparaissent en gras).

⁴ Chloridazon – Summary of classification and Labelling - Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) N° 1278/2008

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

Tableau 1 : Résumé des études de génotoxicité du métabolite DPC de la chloridazone

Type d'essai	Année de réalisation du test	Lignes directrices suivies par le déclarant	Système cellulaire	Doses et concentrations testées
Test d'Ames (test bactérien de mutation génique <i>in vitro</i>)	1992	OCDE 471 (1983)	Souches <i>Salmonella</i> Typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535 et TA 1537 Dénombrement sur plaque standard et test de pré-incubation	20 à 5 000 µg par plaque avec ou sans activation métabolique (S9 de rat) ⁵
Test d'Ames (test bactérien de mutation génique <i>in vitro</i>) classique et modifié selon Prival (Prival et Mitchell 1982)	2022	OCDE 471 (2020)	Souches <i>Salmonella</i> Typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 et <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA Dénombrement sur plaque standard et test de pré-incubation selon Prival	0 ; 33 ; 100 ; 333 ; 1 000 ; 2 500 ; 5 000 µg par plaque avec ou sans activation métabolique (S9 de rat ou de hamster)
Test de mutation génique <i>in vitro</i> au locus HPRT sur cellules de mammifères	1999	OCDE 476 (1997) EEC 87/302 et EPA 870.5300	Cellules de hamster chinois (V79)	31,3 ; 62,5 ; 125 ; 500 µg.mL ⁻¹ avec ou sans activation métabolique (S9 de rat)
Test d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> sur cellules de mammifères	1993	OCDE 473 (1983)	Lymphocytes humains	100 ; 500 ; 1 000 ; 1 500 ; 2 000 µg.mL ⁻¹ avec activation métabolique (S9 de rat) 2 ; 5 ; 10 µg.mL ⁻¹ sans activation métabolique
Test du micronoyau <i>in vivo</i> sur érythrocytes de mammifères	2000	OCDE 474 (1997)	Érythrocytes de souris	87,5 ; 175 ; 350 mg.kg⁻¹ p.c.*

* p.c. : poids corporel

■ Test d'Ames (1992)

Le test d'Ames réalisé en 1992 l'a été dans le respect de la ligne directrice OCDE 471 (OCDE 1983a). 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, avec pré-incubation et incorporation directe à des doses de 20 à 5 000 µg par plaque et sur les

⁵ Le détail des concentrations de DPC n'est pas disponible dans le DAR (annexe B-6, volume 3).

souches de *Salmonella* Typhimurium (TA 98, TA 100, TA 1535 et TA 1537). Le solvant utilisé était le diméthylsulfoxyde (DMSO), tandis que les témoins positifs étaient la N-méthyl-N'-nitroso-N-nitroso-guanidine (MNNG), la 4-nitro-o-phénylènediamine (NPD) et la 9-aminoacridine chloride monohydrate (AAC) en l'absence d'activation métabolique et le 2-aminoanthracène (2-AA) en présence d'activation métabolique. Le DAR (Efsa 2004b) considère ce résultat comme négatif.

► Rappel des conclusions de l'avis du 23 avril 2020 (Anses 2020)

Dans le cadre de cet avis, le CES « Eaux » a rapporté que la souche TA 102 ou une souche capable de détecter certains mutagènes oxydants et des agents pontants n'avaient pas été utilisées. Par ailleurs, concernant le système d'activation métabolique exogène (S9 de rat) utilisé dans le protocole suivi, le CES « Eaux » a considéré que celui-ci était discutable à la lumière de cas documentés dans la littérature. En effet, plusieurs études avaient précédemment montré une différence de résultats pour certains composés aminés pour lesquels des résultats négatifs ou faiblement positifs ont été obtenus en présence de mélange S9 de rat, mais plus fortement positifs en présence de mélange S9 de hamster (Phillipson et Ioannides 1983; Weinstein, Katz et Kazmer 1981). Cette variation inter-espèces pourrait être expliquée en particulier par une activité basale plus forte chez le hamster du cytochrome P (CYP) 448 (Blaich *et al.* 1988; Burke, Prough et Mayer 1977; Prival, King et Sheldon 1979), dont l'activité éthoxyrésorufin O-dééthylase (EROD) serait plus forte en période fœtale et néonatale avant de décroître avec l'âge (Lum, Walker et Ioannides 1985). Cette activité enzymatique spécifique favoriserait notamment la N-hydroxylation des amines aromatiques en composés mutagènes plus facilement par le CYP448 qu'avec le CYP450 (Phillipson et Ioannides 1983; Prival, King et Sheldon 1979).

■ Test d'Ames modifié selon Prival (nouvelle étude transmise en juillet 2022)

Le test d'Ames effectué en 2022 l'a été en utilisant différentes souches de *Salmonella* Typhimurium (TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 98) et *Escherichia coli* (WP2 uvrA), conformément aux lignes directrices OCDE 471 (OCDE 2020), EC 440/2008 B13/B14 et US EPA OPPTS 870.5100.

Le solvant utilisé était le DMSO, tandis que les témoins positifs étaient la MNNG, la NPD, l'AAC et le 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) en l'absence d'activation métabolique et le 2-AA et le rouge congo (CoR) en présence d'activation métabolique.

Le métabolite DPC (pureté 99,8 %) dissous dans du DMSO a été testé à des concentrations de 0, 33, 100, 333, 1 000, 2 500 et 5 000 µg par plaque. Aucune précipitation du composé n'a été observée, même à la plus forte dose.

Une première expérience a été réalisée en l'absence ou en présence d'activation métabolique conformément au test d'Ames classique suivant la méthode par étalement (S9 de foie de rat activé par un mélange de phénobarbital et β-naphtoflavone).

Une seconde expérience a été réalisée sur la base d'un test d'Ames modifié comportant une pré-incubation en l'absence ou en présence d'activation métabolique (mix de S9 de foie de hamster obtenu sans induction, datant de 2005) selon la méthode de Prival⁶ (Prival et Mitchell 1982).

⁶ La méthode Prival correspond à un cas particulier de l'utilisation de S9 de hamster. Elle est destinée aux composés azoïques et diazoïques : le test est réalisé dans des conditions permettant la transformation en composés génotoxiques. La mise en œuvre de cette méthode ne s'avérerait pas indispensable puisque la DPC,

Enfin, une troisième expérience complémentaire, similaire à la seconde, en présence d'activation métabolique uniquement (mix de S9 de hamster obtenu sans induction) a été réalisée selon la méthode de Prival avec un nouveau lot de mix de S9 de hamster datant de 2021, afin, selon le déclarant, de conforter les résultats observés lors de la deuxième expérience.

Les résultats obtenus montrent qu'aucune modification significative n'est observée en présence ou en l'absence d'activation métabolique à toutes les concentrations testées lors de ces trois tests.

Concernant les résultats obtenus avec la souche TA 100 en présence d'activation métabolique lors de la troisième expérience, le CES « Eaux » note que :

- le nombre de révertants des témoins négatifs est nettement supérieur à la plage des témoins historiques correspondants ;
- le nombre de révertants obtenus est sensiblement supérieur à celui observé lors de l'expérience 2 pour les témoins négatifs d'une part et pour les différentes concentrations de métabolite testées dans des conditions similaires d'autre part.

Ces différences de résultats s'expliquent possiblement par l'utilisation d'un lot de S9 différent lors de la troisième expérience. Les résultats sont considérés valides par le déclarant dans la mesure où le composé n'a pas induit une augmentation significative du nombre de colonies révertantes par rapport aux témoins de l'essai. Les résultats de la troisième expérience ont ainsi permis de confirmer ceux obtenus en présence d'activation métabolique lors de l'expérience 2.

Ces déviations sont considérées mineures au vu des données expérimentales dans leur ensemble et n'impactent donc pas l'interprétation faite des résultats.

Le CES « Eaux » estime que le test d'Ames ainsi réalisé permet de conclure que la DPC n'induit pas de mutation génique sur le système étudié au regard des données expérimentales disponibles.

► Mise en parallèle des résultats avec le précédent test d'Ames

Le test nouvellement soumis, comme recommandé dans le précédent avis, inclut une souche comportant une paire de base AT sur le site primaire de réversion, capable de déceler certains mutagènes oxydants et des agents pontants (*E. coli* WP2 uvrA) ainsi qu'un système d'activation métabolique provenant du hamster (deuxième et troisième expériences) afin d'augmenter le pouvoir de détection de mutagénicité des amines aromatiques. Ces changements sont correctement mis en œuvre et considérés acceptables.

■ Test de mutation génique *in vitro* au locus HPRT sur cellules de mammifères

L'induction de mutation au locus HPRT a été étudiée en 1999 vis-à-vis de cellules de hamster chinois V79 selon des lignes directrices OCDE 476 (OCDE 1997b) (révisées en 2016 (OCDE 2016c)), EEC 87/302⁷ et EPA 870.5300 (EPA 1998). Les cellules V79 ont été traitées à des concentrations allant de 31,3 à 500 µg.mL⁻¹ de DPC (pureté 99,8 %), en présence et en

n'étant pas un composé azoïque ou diazoïque, ne nécessite pas ces conditions de réduction ; elle répond néanmoins aux attentes puisque l'expérience réalisée conduit à utiliser du mix de S9 de hamster.

⁷ Annexe (Partie B) de la directive de la Commission du 18 novembre 1987 portant neuvième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

l'absence d'activation métabolique (S9 de foie de rat induit par du phénobarbital et de la β -naphthoflavone). Les auteurs précisent que la solubilité limitée dans le DMSO n'a pas permis de tester des doses plus importantes.

► Rappel des conclusions de l'avis du 23 avril 2020 (Anses 2020)

Dans le DAR (Efsa, 2004b), 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. Cette conclusion avait été reprise par le CES « Eaux ».

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

Le potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques *in vitro* a été testé en 1993 conformément à la ligne directrice de l'OCDE 473 (OCDE 1983b).

Les lymphocytes humains ont été exposés à la DPC (pureté 98,2 %) en présence d'activation métabolique (S9 de foie de rat induit par de l'Aroclor 1254) pendant 3 heures à des concentrations comprises entre 100 et 2 000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, et en l'absence d'un système exogène d'activation métabolique pendant une durée inconnue à des concentrations comprises entre 2 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Une seconde expérimentation a été réalisée à la concentration de 2 000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en présence d'activation métabolique.

► Rappel des conclusions de l'avis du 23 avril 2020 (Anses 2020)

Le CES « Eaux » a noté que :

- seulement 100 métaphases ont été analysées au lieu des 300 métaphases recommandées dans la ligne directrice OCDE 473 révisée en 2016 (OCDE 2016a) ;
- le choix des doses testées apparaît mal justifié dans le résumé et la plus forte dose testée sans activation métabolique est très faible (seulement 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Le DAR (Efsa 2004b) et l'« *Efsa Journal* » ont conclu qu'aucune preuve d'effet clastogène n'a été observée dans les conditions de cette étude. Le CES « Eaux » a estimé toutefois que cette étude présentait des déviations importantes avec la ligne directrice actuellement en vigueur, 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 en raison du faible nombre de cellules métaphasiques observées.

■ Test du micronoyau *in vivo* (étude complémentaire transmise en juillet 2022)

En 2000, une étude de l'évaluation de la capacité de la DPC à induire l'apparition de micronoyaux dans la moelle de souris a été réalisée, conformément à la ligne directrice OCDE 474 (OCDE 1997a) (cette dernière a été révisée en 2016 (OCDE 2016b)). Cette étude semble n'avoir pas été incluse initialement au dossier d'évaluation de la SA et a été communiquée par le déclarant suite à publication de l'avis de l'Anses du 23 avril 2020.

Selon le rapport transmis par le déclarant, une étude préliminaire de recherche de la dose maximale tolérée (DMT) par étapes successives a été réalisée (chronologiquement aux doses de 500 puis 400, 300 et enfin 350 mg.kg^{-1} p.c.). Lors de cette étude préalable, les quantités injectées de DMSO étaient respectivement égales à 6, 5, 4 et 4 mL.kg^{-1} p.c. Les animaux (souris NMRI, 2 animaux par sexe et par niveau de dose) ont fait l'objet d'une évaluation comportementale (et de viabilité) à 1, 6, 24 et 48 heures. Sur la base de cette étude préliminaire, la dose de 350 mg.kg^{-1} p.c. a été proposée comme étant la DMT, telle que définie

dans la ligne directrice OCDE 474 (OCDE 2016b), c'est-à-dire n'induisant pas de toxicité limitante, ici définie par la mort des animaux traités.

Le potentiel d'induction de micronoyaux *in vivo* a été investigué chez des souris mâles et femelles (5 animaux par sexe et niveau de dose). Le métabolite DPC (99,8 % de pureté) dilué dans du DMSO (4 mL.kg⁻¹ p.c.) et a été administré une seule fois aux doses de 87,5, 175 et 350 mg.kg⁻¹ p.c. par voie intrapéritonéale (i.p.). Après exposition, les animaux ont été sacrifiés à 24 heures pour toutes les doses testées et 48 heures, uniquement pour la dose la plus forte. Un total de 2 000 érythrocytes polychromatiques (PCE) a été analysé par animal pour la présence de micronoyaux. En outre, le rapport des PCE aux érythrocytes normochromatiques (NCE) a été déterminé.

Aucune des concentrations testées n'a entraîné de modification statistiquement significative du nombre de micronoyaux par rapport au témoin, aussi bien à 24 qu'à 48 heures. Au temps 24 heures, les témoins négatifs et positifs restent en accord avec les témoins historiques de la manipulation.

Cependant, le CES « Eaux » relève plusieurs déviations :

- L'étude servant à fixer la DMT n'a pas considéré le possible effet toxique du vecteur solvant, le DMSO, injecté en i.p. à 4 mL.kg⁻¹, soit 4,4 g.kg⁻¹ par rapport à la substance testée (incrément des doses se traduisant par un incrément de la quantité de DMSO injectée). En effet, ce solvant est toxique chez les rongeurs et, au même titre que l'ensemble des solvants organiques, son usage n'est pas recommandé pour ce test (Hayashi *et al.* 1994). La dose injectée ici est au-dessus des pratiques recommandées chez la souris et décrites dans la littérature, à savoir une teneur de DMSO ne devant excéder 40 % et une dose inférieure à 2,2 g.kg⁻¹ lors d'une injection par voie intraveineuse (Thackaberry *et al.* 2014). Les doses utilisées ici lors de la recherche de la DMT se rapprochent de la dose létale 50 (DL50) chez la souris de 11 g.kg⁻¹, valeur obtenue pour ce solvant utilisé pur en i.p. (Worthley et Schott 1969). En outre, l'étude préalable à l'établissement de la DMT basée sur l'injection par voie i.p. de 6 mL.kg⁻¹ p.c. de DMSO seul a mis en lumière une diminution de l'activité spontanée au bout de 6 heures sous l'effet de ce solvant à cette concentration. Ces données ne préjugent en rien de l'absence d'effet propre du solvant à la concentration retenue pour la réalisation du test final (4 mL.kg⁻¹ p.c.) d'autant que les effets neurotoxiques observés à la plus forte dose de métabolite sont proches de ceux observés pour le DMSO, aussi bien à la dose de 6 mL.kg⁻¹ p.c. que lors de l'étude de Thackaberry *et al.* (2014). Ainsi, il ne peut être exclu que dans les conditions expérimentales considérées, les deux molécules (DMSO et DPC) aient vu leurs effets s'additionner et que la DMT de la substance testée n'ait pas été atteinte.
- Dans le cas présent, le test n'a pas montré d'effet sur les proportions de micronoyaux pour les deux premières doses testées à 24 heures. Cependant, une augmentation de la proportion de micronoyaux, non statistiquement significative, a été observée à 24 heures, ainsi qu'à 48 heures à la plus forte dose (seule dose testée à 48 heures) et pour un comptage de 2 000 cellules. Des analyses statistiques réalisées par Kissling *et al.* (2007) ont montré que les tests du micronoyau *in vivo* ont le pouvoir de détecter des effets 2 à 3 fois supérieurs aux témoins avec une puissance satisfaisante, sur la base d'un comptage d'environ 4 000 cellules par animal lorsque seuls 5 animaux sont utilisés et que les fréquences spontanées de micronoyaux sont relativement élevées (0,1 % et plus). Cependant, des échantillons de plus grande taille (soit plus d'animaux

et/ou plus de cellules par animal) sont nécessaires lorsque la fréquence spontanée de micronoyaux est plus faible (c'est-à-dire < 0,1 %) ce qui est le cas ici. Dans les conditions expérimentales présentes, les experts notent que des effets toxiques propres à chacun des sexes ont été documentés dans le DAR (Efsa, 2004b) (atteintes rénales et hépatiques), ce qui peut mettre en doute la possibilité de pouvoir « pooler » ces deux groupes, conformément à la ligne directrice OCDE 474 (OCDE 2016b). De plus, la fréquence de fond moyenne des érythrocytes immatures micronucléés est très proche voire inférieure à 0,1 % dans cette étude (respectivement 0,085 % et 0,025 % à 24 et 48 heures). D'après la ligne directrice 474 (OCDE 2016b), cette condition est considérée comme devant favoriser l'examen de cellules supplémentaires, au-delà de 4 000 PCE. Au vu de cette situation, l'examen de cellules supplémentaires apporte une plus grande puissance à ce test. Des simulations utilisant des distributions binomiales réalisées par l'Anses en mars 2023 mettent en évidence qu'un comptage d'au moins 4 000 cellules tenant compte des proportions observées dans le test à 48 heures, aurait augmenté la puissance du test au-delà de 80 % et les résultats du test statistique retenu par le déclarant auraient été à la limite de la significativité ($p=0,05$).

- Enfin, les experts notent que les résultats historiques des contrôles négatifs rapportés dans cette étude ne sont pas datés, ne distinguent pas les données 24 et 48 heures et que le résultat expérimental observé à 48 heures ne se situe pas dans l'intervalle de confiance des contrôles historiques (valeur légèrement inférieure à la limite basse des contrôles historiques).

Le CES « Eaux » souligne que les deux premières déviations, à savoir une possible sous-estimation de la DMT d'une part et la sensibilité insuffisante du test statistique d'autre part, peuvent favoriser la non-significativité des résultats observés à 24 heures et 48 heures.

Ainsi, pour l'ensemble des raisons énoncées ci-dessus, les critères d'acceptabilité du test tels que figurant dans la ligne directrice OCDE 474 (OCDE 2016b) ne sont pas remplis. Les incertitudes relatives à la clastogénicité du métabolite DPC formulées dans le précédent avis ne sont donc pas levées par ce nouveau test.

■ Conclusions sur le potentiel génotoxique de la DPC

Dans la littérature, certaines amines aromatiques sont connues pour être cancérigènes, en particulier pour la vessie et pour les reins. Certaines études disponibles dans le DAR (Efsa 2004b) mettent en évidence des signes de toxicité pouvant être considérés comme des signaux d'alerte, notamment :

- 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⁻¹. 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⁻¹. Des signes de toxicité rénale et vésicale (hyperplasies) 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 0, 15 et 29 mg.kg⁻¹. Des signes de toxicité rénale (augmentation du poids) sont notés à la plus forte dose testée ;

- 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⁻¹. Des signes de toxicité rénale et vésicale (augmentation du poids, dilatations du pelvis et de la vessie, dysplasie) sont notés à la plus forte dose testée.

Le CES « Eaux », dans son avis du 23 avril 2020, soulignait que la survenue quasi-systématique des atteintes rénales et vésicales dans les études de toxicité répétée jusqu'à 3 mois constituait un signal d'alerte vis-à-vis d'un potentiel effet cancérigène que ne dissipaient pas la batterie d'essais de génotoxicité/mutagenicité *in vitro* et l'absence d'étude de cancérogénèse de la DPC.

Au vu des données disponibles à ce jour, de la recherche bibliographique réalisée en complément qui n'a pas apporté d'élément complémentaire pertinent, et en l'absence de tests de cancérogénèse, le CES « Eaux » confirme sa position du 23 avril 2020 et réaffirme que la batterie d'essais de génotoxicité/mutagenicité *in vitro* et *in vivo* ne doit souffrir d'aucune déviation.

Ainsi, considérant :

- **les conditions de réalisation du test d'aberration chromosomique *in vitro* et du test du micronoyau *in vivo* (étude complémentaire transmise en juillet 2022), qui n'ont pas permis de statuer quant aux résultats obtenus,**
- **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 et du GT « ERS EDCH », considère qu'il n'est pas possible de conclure sur l'absence de potentiel génotoxique de la DPC.

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

Sur la base des données des monographies européennes, des nouvelles études de génotoxicité transmises par le déclarant 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 ».**

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie par la Direction générale de la santé pour réexaminer le caractère « pertinent » ou « non pertinent » du métabolite desphényl-chloridazone à la lumière de nouvelles données transmises par la société BASF, titulaire d'autorisations – échues à ce jour – de produits à base de la substance active chloridazone. Ce réexamen s'est appuyé sur la méthodologie

élaborée par l'Agence dans le cadre de son avis du 30 janvier 2019, en prenant en compte les données les plus récentes disponibles.

L'Agence adopte les conclusions du GT « ERS EDCH » et du CES « Eaux » et considère, au vu de l'analyse des données scientifiques, que la pertinence pour les eaux destinées à la consommation humaine du métabolite desphényl-chloridazone reste justifiée.

L'Anses rappelle que cet avis constitue le résultat d'une évaluation scientifique et une proposition de classement dans le cadre des dispositions de surveillance de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Les conclusions de cette expertise ont pour objectif d'appuyer les autorités sanitaires (Direction générale de la santé et Agences régionales de santé) dans leurs décisions à ce sujet.

Pr Benoit Vallet

MOTS-CLÉS

Pesticides, métabolite, pertinence, EDCH, eau de boisson, desphényl-chloridazone.
Pesticides, metabolite, relevant, drinking-water, desphenylchloridazon.

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.*
- Anses. 2020. *Avis de l'Anses du 23 avril 2020 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.*
- Blaich, G., M. Göttlicher, P. Cikryt et M. Metzler. 1988. "Induction of P-450 isoenzyme activities in Syrian golden hamster liver compared to rat liver as probed by the rate of 7-alkoxyresorufin-O-dealkylation." *Chem Biol Interact* 67 (1-2): 129-38. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(88\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0009-2797(88)90092-0).
- Burke, M. D., R. A. Prough et R. T. Mayer. 1977. "Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction. Ethoxyresorufin O-de-ethylation." *Drug Metab Dispos* 5 (1): 1-8.
- Efsa. 2004a. *Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. Chloridazon_DAR_01_Vol 1.pdf – Non publié.*
- Efsa. 2004b. *Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. Chloridazon_DAR_09_Vol 3_B6.pdf – Non publié.*
- Efsa. 2004c. *Draft Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) n°1107/2009 – Rapporteur Member State : Germany. Chloridazon_DAR_12_Vol 3_B9.pdf – Non publié.*
- Efsa. 2007. *Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chloridazon., 1-82.*
- EPA. 1998. *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5300 In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test.* United States Environmental Protection Agency.
- Hayashi, M., R. R. Tick, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson, Jr, F. Pacchierotti, F. Romagna et H. Shimada. 1994. "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. ." *Mutat Res* 312 (3): 293-304. . [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90039-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90039-6).
- Kissling, G. E., S. D. Dertinger, M. Hayashi et J. T. MacGregor. 2007. "Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability." *Mutat Res* 634 (1-2): 235-40. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.010>.
- Lum, P. Y., S. Walker et C. Ioannides. 1985. "Foetal and neonatal development of cytochrome P-450 and cytochrome P-448 catalysed mixed function oxidases in the rat: induction by 3-methylcholanthrene." *Toxicology* 35 (4): 307-17. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(85\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0300-483x(85)90064-2).

- OCDE. 1983a. OCDE 471. *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. 1983b. OCDE 473. *Ligne directrice 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. 1997a. OCDE 474. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères*. Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).
- OCDE. 1997b. OCDE 476. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essais in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes HPRT et XPRT*. Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).
- OCDE. 2016a. OCDE 473. *Ligne directrice 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. 2016b. OCDE 474. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères*. Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).
- OCDE. 2016c. OCDE 476. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essais in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes HPRT et XPRT*. Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).
- OCDE. 2020. OCDE 471. *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).
- Phillipson, C. E. et C. Ioannides. 1983. "Activation of aromatic amines to mutagens by various animal species including man." *Mutat Res* 124 (3-4): 325-36. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90203-3](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90203-3).
- Prival, M. J., V. D. King et A. T. Sheldon, Jr. 1979. "The mutagenicity of dialkyl nitrosamines in the Salmonella plate assay." *Environ Mutagen* 1 (2): 95-104. <https://doi.org/10.1002/em.2860010202>.
- Prival, M. J. et V. D. Mitchell. 1982. "Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in Salmonella typhimurium in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9." *Mutat Res* 97 (2): 103-16. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(82\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0165-1161(82)90008-5).
- Thackaberry, E. A., X. Wang, M. Schweiger, K. Messick, N. Valle, B. Dean, A. Sambrone, T. Bowman et M. Xie. 2014. "Solvent-based formulations for intravenous mouse pharmacokinetic studies: tolerability and recommended solvent dose limits." *Xenobiotica* 44 (3): 235-41. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845706>.
- Weinstein, D., M. Katz et S. Kazmer. 1981. "Use of rat/hamster S-9 mixture in the Ames mutagenicity assay." *Environ Mutagen* 3 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1002/em.2860030102>.
- Worthley, Elmer G. et C. Donald Schott. 1969. "The toxicity of four concentrations of DMSO." *Toxicology and Applied Pharmacology* 15 (2): 275-281. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-008X\(69\)90027-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0041-008X(69)90027-1).

Législation et réglementation

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.

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.

Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal officiel de l'Union européenne. L435 du 23 décembre 2020, p1-62.

Directive de la Commission du 18 novembre 1987 portant neuvième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

Arrêté du 11 janvier 2007 modifié relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R1321-2, R1321-3, R1321-7 et R1321-38 du code de la santé publique.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis de l'Anses relatif au réexamen du classement de la pertinence pour le métabolite desphényl-chloridazone dans les eaux destinées à la consommation humaine. (saisine 2022-SA-0162-a). Maisons-Alfort : Anses, 18 p.

ANNEXE 1 – SCHÉMA DÉCISIONNEL DE LA PERTINENCE DES MÉTABOLITES DE PESTICIDES POUR LES EDCH

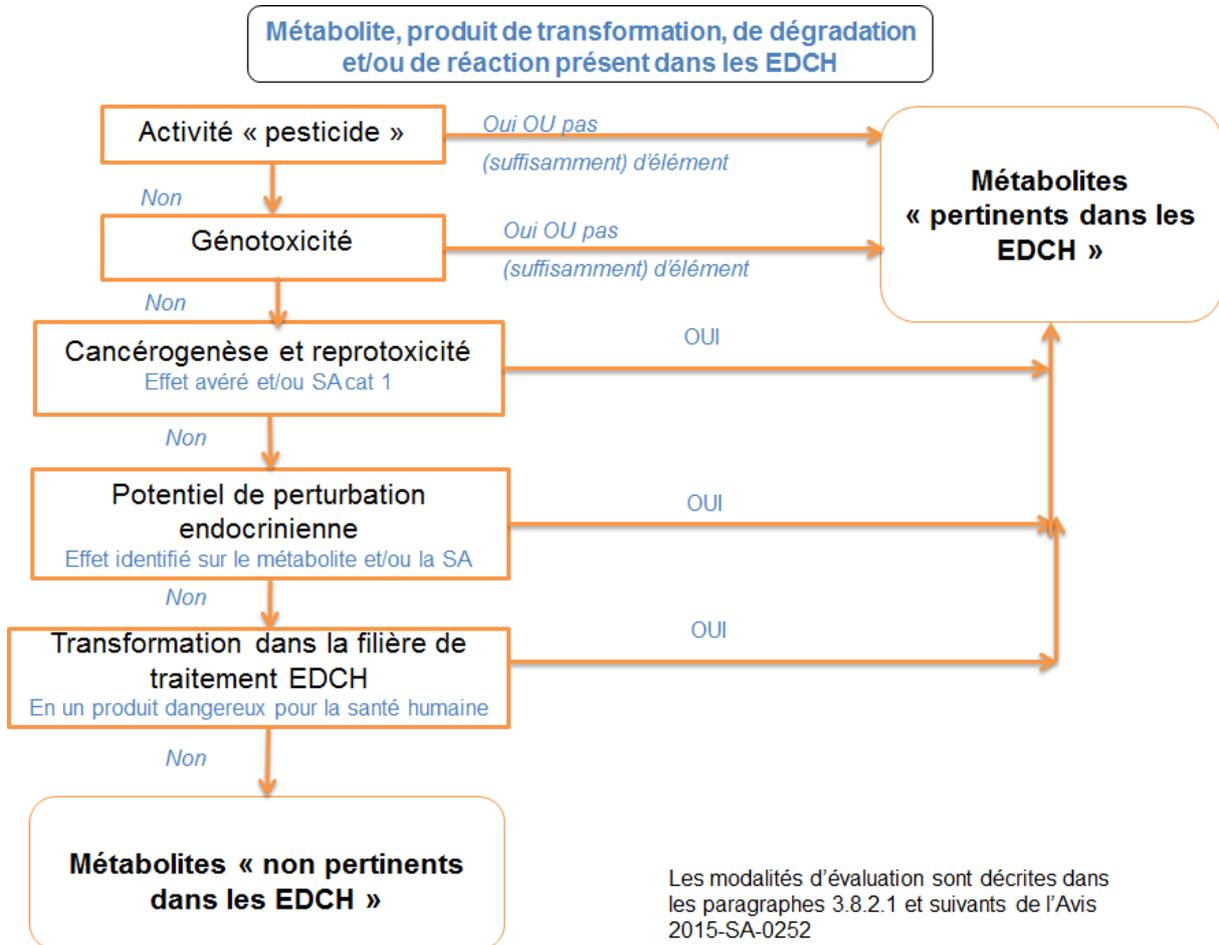


Figure 1 : Schéma décisionnel de la pertinence des métabolites de pesticide pour les EDCH (d'après l'avis de l'Anses 2015-SA-0252 du 30 janvier 2019).

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.

GROUPE DE TRAVAIL « ERS EDCH III » (2020-2023)

Président

M. Michel JOYEUX – Médecin toxicologue, retraité d'Eau de Paris et de l'École Pratique des Hautes Études (EPHE) - Compétences : toxicologie, évaluation quantitative des risques sanitaires et méthode d'analyse des dangers, chimie de l'eau, produits et procédés de traitement des EDCH, santé environnementale.

Membres

Mme Aurore COLLIN – Pharmacien toxicologue, Maître de conférence à l'Université Clermont-Auvergne - Compétences : toxicologie (hépatotoxicité, neurotoxicité, génotoxicité), évaluation quantitative des risques sanitaires, valeurs toxicologiques de référence.

M. Fabrice DASSONVILLE – Ingénieur du génie sanitaire, responsable régional du domaine des eaux / périnatalité et santé environnement / air extérieur (pollens et allergies) / pesticides à l'Agence Régionale de Santé de Provence Alpes Côte d'Azur (ARS PACA) - Compétences : santé environnementale, évaluation et gestion des risques sanitaires (risques chimiques et bactériologiques), EDCH, base de données SISE-Eaux.

M. Joseph DE LAAT – Professeur des universités en chimie, retraité de l'Université de Poitiers - Compétences : chimie des eaux, traitement des eaux (oxydation chimique, adsorption sur charbon actif, désinfection et photolyse UV, procédés membranaires), cinétique chimique, conception et dimensionnement de stations d'épuration.

Mme Isabelle DUBLINEAU – Ingénieur évaluation des risques radiologiques à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) - Compétences : radiotoxicologie (système digestif, néphrotoxicité), EDCH, contamination environnementale.

Mme Barbara LE BOT – Professeur des Universités en chimie analytique à l'École des Hautes Études en Santé Publique (EHESP) - Compétences : constituants et contamination des eaux transferts et devenir dans l'environnement, évaluation des expositions, analyses des eaux (polluants émergents, contrôle sanitaire des EDCH), santé environnementale.

Mme Marion MORTAMAIS – Vétérinaire épidémiologiste, chercheur postdoctoral au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier - Compétences : épidémiologie, statistiques, neurotoxicité.

M. Christophe ROSIN – Unité chimie des eaux - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN), Anses – Compétences : chimie des eaux, analyses chimiques des eaux (développement et validation de méthodes, éléments minéraux, micropolluants organiques, prélèvements d'eau).

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT – Pharmacien, Professeur des Universités en Santé Publique à l'Université Clermont-Auvergne - Compétences : santé environnementale, épidémiologie, évaluation quantitative des risques sanitaires.

Mme Camille SAVARY – Pharmacien toxicologue, Maître de conférence à l'Université d'Angers - Compétences : toxicologie (toxicologie cellulaire et moléculaire, hépatotoxicité, toxicité des nanoparticules), pesticides et métabolites de pesticide.

RAPPORTEURS

Mme Aurore COLLIN – Pharmacien toxicologue, Maître de conférence à l'Université Clermont-Auvergne - Compétences : toxicologie (hépatotoxicité, neurotoxicité, génotoxicité), évaluation quantitative des risques sanitaires, valeurs toxicologiques de référence.

M. Jean-Ulrich MULLOT – Pharmacien en chef, Service de santé des armées, Ministère de la Défense - Compétences : toxicologie générale, réglementation EDCH et produits phytosanitaires, évaluation européenne des produits phytosanitaires et de leurs métabolites.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Lauren ARPIN-PONT – Direction d'évaluation des risques, unité d'évaluation des risques liés à l'eau – Anses

Contribution scientifique

Mme Adeline CAVELIER – Direction d'évaluation des produits réglementés – Anses

M. Bertrand DESPREZ – Direction d'évaluation des produits réglementés – Anses

Mme Farida OUADI – Direction d'évaluation des produits réglementés – Anses

Secrétariat administratif

Mme Françoise LOURENCO – Anses