

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
UNIVERSITE ABDELHAMID BEN BADIS-MOSTAGANEM FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE



Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de MASTER II

Option : contrôle de qualité des aliments

THEME :

**Étude des risques liés à l'utilisation
des fongicides SDHI et impact sur
l'environnement et la santé humaine**

Présenté par Mr : KLAA Abderahmane

Devant le jury :

Président Mr: GHLAMALLAH Amine

Encadreur Mr: BENABDELMOUMENE Djilali

Examineur Mr : SASSI Hachemi

Année universitaire : 2019/2020

Remerciement

**Au terme de ce travail, nous remercions Allah, le bon Dieu miséricordieux de
Nous avoir aidés à réaliser ce travail.**

**Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissances a toutes les personnes
qui par leur aide et leurs encouragements nous ont permis de réaliser ce travail
dans les meilleures conditions**

**Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à mon encadreur
Mr BENABDELMOUMENE Djilali: qui a bien voulu diriger ce travail, nous la
remercions aussi d'en avoir partagé ses connaissances et pour sa disponibilité tout
au long de la réalisation de ce travail.**

**Je remercie Mr GHLAMALLAH Amine qui m à fait l'honneur de présider le
jury et pour son aide**

**Je remercie Mr : SACI Elhachemi pour son soutien et son aide, particulièrement
lors de la rédaction, et leurs explications avisées.**

**Un grand merci à tous les professeurs du Département d'agronomie, auxquels je
dois ma formation.**

Dédicace

Je dédie le fruit de mes études avec toute sincérité,

A mes parents, qui m'ont guide vers le tunnel éclairé du savoir, qui
m'ont oriente vers le chemin qui mon soutenue durant toute ma vie

Tous mes frères pour leur appui et leur
encouragement.et mes sœurs

Que dieu les soigne.

Et Je dédie du fond du cœur ce modeste travail à :

A ma famille,

Merci pour votre soutien inconditionnel et votre bienveillance. Surtouts
mes enfants : Mahfoud et Mounir

Toute la famille de « KLAA »

Tous les professeurs et les étudiants Option : contrôle de qualité des
aliments promotion 2019-2020.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Catégorie d'usage des pesticides

Tableau 02: Liste des substances actives SDHI approuvées en Anses, 2019.

Tableau 03 : Concentrations en boscalid dans les matrices apicoles.

Tableau 04 : Concentrations en Fluopyram dans les matrices apicoles.

Tableau 05 : Milieux de culture permissifs GlucoMax et non permissifs MitoMax

Tableau 06 : Effets inhibiteurs (valeurs IC50) de huit SDHI sur les activités de la chaîne respiratoire

Liste des figures

Figure 1 : Estimation de la consommation mondiale de PPP pour l'année 2009 par région du monde et par catégorie de produits.

Figure 02 : Cible des fongicides affectant les processus respiratoires.

Figure. 3 : Structure moléculaire des SDHI.

Figure 4 : Valeurs des IC50 des SDHI sur la succinate cytochrome.

Liste des abréviations.

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du travail

Aprifel : Agence pour la recherche et l'information en fruit et légumes frais

ATP : Adénosine Triphosphate

CAP : Centre Anti-Poison

CMR : Carcinogène Mutagène et Reprotoxique

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DL50 : Dose létale à 50%

EFSA : European Food Safety Authority

EPI : Equipement de Protection Individuelle

FRAC : Comité d'Action de Résistance des Fongicide

INRA : Institut National de Recherche en Agronomie

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

MRL : Maxcimal Residu Level (ou LMR pour limite maximale de résidu)

MSA : Mutualité Sociale Agricole

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

PPM : Partie par millions (unité de mesure : 1 ppm = 1 kg/Mkg)

PPP : Produits de protection des plantes

SA : Substance Active

SDH : Succinate Déshydrogénase

SDHi : Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase

VTR : Valeurs Toxicologiques de Référence

Table des matières

Remercîment	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	01

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01: Les pesticides

1.1-Définitions des pesticides	03
1.2-Utilité de l'utilisation des pesticides.....	04
1.3-Consommation de produits phytopharmaceutiques	05
1.3.1-Chiffres clés sur la consommation.....	05
1.3.2- Catégorie d'usage des pesticides	06
1.4-Caractéristique générale des fongicides	07

Chapitre 02: Classification des fongicides

2.1-Classification des fongicides par mode d'action	09
2.1.1- Fongicides affectant le processus respiratoire	09
2.1.2- Fongicides affectant les biosynthèses.....	12
2.1.3- Fongicides agissant sur les microtubules	14
2.2- les fongicides SDHI.....	14

Chapitre 03 : les effets des pesticides et Les substances SDHI.

3.1- Les substances SDHI et des usages autorisés.....	18
3.2-Données de vente, d'utilisation et de vigilance concernant les SDHI.....	19
3.3.1- Données de vente et d'utilisation.....	17
3.3.2- Données de phytopharmacovigilance.....	18
3.3.2.1- Denrées alimentaires destinées à la consommation humaine.....	20
3.3.2.2- Eaux de surface.....	23
3.3.2.3-Eaux destinées à la consommation humaine et eaux souterraines.....	24
3.3.2.4-Evaluation des risques alimentaires pour le consommateur	25
3.3.2.5-Air ambiant	26
3.3.2.6-Cas d'intoxication en santé animale (faune sauvage et animaux domestiques)	26
3.3.2.7.1- Mortalités massives aiguës	27
3.3.2.7.2- Contamination des matrices apicoles	27
3.4-.Fixation de la limite maximale de résidus (LMR).....	28
3.5-La dose journalière admissible (DJA)	29

PARTIE II: EXPERIMENTATION : Résumés

1. Sensibilité de la chaîne respiratoire mitochondriale aux pesticides SDHI et conséquence sur les cellules humaines en culture.

1.1. Résumé.....	31
1.2. Introduction.....	32
1.3. Matériels et Méthodes.....	33
1.4. Résultats.....	38
1.5. Discussion.....	40
1.6. Conclusion.....	43

2- Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs cellules humaines en culture

2.1. Résumé.....	45
2.2. Introduction.....	46
2.3. Description des différents phénotypes associés aux mutations dans les gènes du cycle	
2.4. Deux univers de maladies humaines	47
2.5. Conclusion.....	48

3- Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides (SDHI)»

3.1. Résumé	49
3.2. Introduction	50
3.3- Hypothèses identifiées auprès des chercheurs lanceurs d'alerte, relatives aux substances actives SDHI.....	51
3.4- Hypothèse d'effets sanitaires chez l'Homme comparables à ceux identifiés chez les malades porteurs de mutations de la SDH.....	52
3.5-Conclusion.....	54
3.6-Conclusions générale.....	55

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Le travail que nous avons abordé se situe dans le cadre général de l'étude de la préservation de l'environnement et la santé humaine. Pour cela nous nous sommes choisis de faire une étude bibliographique des risques liés à l'utilisation des fongicides **SDHI** et impact sur l'environnement et la santé humaine.

Les **Inhibiteurs de la Succinate DésHydrogénase (SDH) (SDHI)** sont utilisés dans le monde entier pour limiter la prolifération de moisissures sur les plantes et leurs produits. Toutefois, la SDH, également appelé complexe II de la chaîne respiratoire, est un composant universel des mitochondries qui sont présentes dans quasi tous les organismes vivants.

La SDH est restée particulièrement conservée au cours de l'évolution, et l'on peut légitimement s'interroger sur la spécificité des SDHI vis-à-vis des seules moisissures. Ici, nous établissons d'abord que la SDH de l'homme, de l'abeille domestique, du ver de terre et des champignons sont toutes sensibles aux huit SDHI testés, avec toutefois des valeurs d'IC50 variables, généralement de l'ordre de la micro-molaire. Nous avons ensuite observé que cinq des SDHI, principalement de la dernière génération, inhibent, outre la SDH, l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire.

MOTS-CLES: fongicide, SDHI, mitochondries, signal, santé humaine, environnement

Abstract

The work we discussed is part of the overall study of environmental conservation and human health. For this purpose, we have chosen to conduct a bibliographic study of the risks associated with the use of SDHI fungicides and the impact on the environment and human health.

Succinate Déshydrogénase (SDHI) Inhibitors are used worldwide to limit the proliferation of mold on plants and their products. However, SDH, also known as the respiratory chain complex I, is a universal component of mitochondria that are present in almost all living organisms.

The SDH has been particularly conserved over the course of evolution, and there is a legitimate reason to question the specificity of HDS with respect to mold alone. Here, we first establish that the human, domestic, worm and fungus SDH are all sensitive to the eight tested SDHIs, but with variable IC50 values, usually in the order of the micromolar. We then observed that five of the IHDS, mostly of the latest generation, inhibited, in addition to HDS, the activity of the respiratory chain complex III.

KEYWORDS: fungicide, SDHI, mitochondria, signal, human health, environment

ملخص

لقد ارتأينا في هذا البحث المتواضع الذي يندرج ضمن الإطار العام لدراسة الحفاظ على البيئة وصحة الإنسان. لذا اخترنا إجراء دراسة ببيولوجيا للمخاطر المرتبطة باستخدام مبيدات الفطريات من عائلة SDH وتأثيرها على البيئة وصحة الإنسان.

ان استخدام مثبطات إنزيم هيدروجيناز السكسينات (SDHI) في جميع أنحاء العالم للحد من نمو الفطريات على النباتات ومنتجاتها. الى ان هذا الأخير، المعروف أيضًا باسم المركب السلسلة التنفسية II، هو مكون أساسي للميتوكوندري الموجودة في جميع الكائنات الحية تقريبًا.

ظلت SDH محفوظة بشكل خاص أثناء التطور، ويمكن للمرء أن يتساءل بشكل شرعي عن خصوصية SDHI تجاه الفطريات. كما يثبت هذا البحث ان البشر، النحل، الديدان الأرضية، والفطريات كلها حساسة للمواد الكيميائية الثمانية من عائلة SDHI التي تم اختبارها، ولكن مع القيم IC50 المختلفة، بشكل عام بترتيب التسلسلي. ثم لاحظنا أن خمسة من المواد الكيميائية الفعالة من عائلة SDHI، خاصة من الجيل الأخير، تمنع نشاط المركب III من السلسلة التنفسية.

الكلمات الرئيسية: مبيدات الفطريات، SDHI، الميتوكوندري، الإشارة، صحة الإنسان، البيئة

Introduction

Les humains ont utilisé des pesticides depuis 500 ans avant J.C. en quantité considérables en agriculture intensive pour protéger leurs cultures. Les deux guerres mondiales ont marqué un tournant décisif pour l'industrie agrochimique moderne (KHADDAM- BENADJAL, 2012).

Les produits phytosanitaires sont des substances chimiques destinées à détruire ou combattre les organismes nuisibles ou végétaux. L'usage des produits phytosanitaires est en augmentation continue, notamment dans les pays en voie de développement à cause de l'accroissement des populations.

Ces pesticides posent un véritable problème de santé publique, et pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour le consommateur. En effet, ces substances organiques présentant même à des faibles quantités, pendant des périodes longues peuvent poser de nombreux problèmes sanitaires. Des études épidémiologiques montrent que les pesticides peuvent développer de nombreuses maladies tel que : le cancer, les malformations congénitales, les problèmes d'infertilité et les problèmes neurologiques avec plus de fréquence chez les gens directement exposés.

Face à cette situation, une seule solution : mieux évaluer les pesticides pour interdire à priori tous ceux qui présentent un potentiel toxique pour l'homme avéré ou même suspecté et surtout diminuer considérablement l'usage des pesticides en changeant d'urgence le type d'agriculture pratiquée dans notre pays.

L'utilisation agricole des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) et les conséquences potentielles sur la santé des professionnels exposés d'une part et d'autre part des consommateurs posent un certain nombre de questions concernant leur impact potentiel sur la santé humaine, au regard de l'absence de spécificité de ces molécules vis-à-vis des champignons.

En Avril 2018, un collectif de scientifiques de l'INSERM, du CNRS, de l'INRA et de l'Université Paris Descartes issus de disciplines différentes, biochimie, biologie moléculaire, médecine, toxicologie lancent une alerte dans la tribune publiée par Libération concernant l'utilisation des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) en demandant leur suspension au regard de leurs

potentiels effets néfastes sur la santé humaine. Un groupe d'expertise d'urgence mis en place quelques mois plus tard par l'ANSES chargé nationalement d'évaluer les risques sanitaires en lien avec l'utilisation des pesticides fut chargé d'évaluer la pertinence de l'alerte.

En Janvier 2019 l'ANSES rendit son avis sur la question (SDHI) en concluant « à l'absence d'éléments en faveur de l'existence d'une alerte sanitaire » et ce en dépit de nombreuses lacunes dans les connaissances sur le mode d'action de ces molécules, leurs métabolisation dans l'organisme, de leurs mécanismes de toxicité, des niveaux d'imprégnation des professionnels exposés ainsi que la population générale, et des potentiels effets sur la santé des êtres humains et des écosystèmes le tout requérant des études complémentaires (Marie CADET,2019).

Chapitre 01

Les pesticides

1. Définitions des pesticides

Le terme "**pesticides**" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée substance active (anciennement dénommée matière active), à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de «formulant» (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (ACTA, 2005)

Les produits phytosanitaires, étymologiquement dédiés à la santé des plantes, comprennent par extension les produits utilisés pour lutter contre les ennemis des cultures. Autrement dit, ils englobent les pesticides, substances utilisées pour lutter contre des organismes nuisibles. Dérivé du latin *pestis* (fléau) et *caedere* (tuer), ils visent plusieurs cibles d'où dérivent leurs noms : insecticides, rodenticides (contre les petits rongeurs), herbicides ou désherbants, fongicides, acaricides, nématicides (contre les vers), molluscicides (contre les limaces).

Ces produits, de synthèse pour la plupart, sont très hétérogènes sur le plan chimique et ont une toxicité très variable. On dénombre plus d'un millier de molécules différentes, aux caractéristiques physico-chimiques très diverses, classées en fonction de leur structure chimique : organophosphorés, carbamates...etc. Ces produits sont présents chez la majorité de la population en faibles quantités (LEVEAU, 2016).

Ces produits ont pour but de :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci-après ;
- Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives ;

- Assurer la conservation des végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières ;
- Détruire les végétaux indésirables ou les parties végétales ;
- Freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux, par une action chimique ou biologique (AISSAOUI, 2012).

La Food and Agriculture Organization (FAO) définit ainsi les pesticides (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) : « toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et autres endo ou ecto-parasites (Dorothee BATSCH., 2011).

I.2- Utilité de l'utilisation des pesticides

D'après Cooper et Dobson (2007), le bénéfice le plus considérable de l'introduction des pesticides est le gain très important sur les rendements dans les exploitations agricoles qui ont fait appel à ces substances. Pour les agriculteurs, l'utilisation de ces produits est un gain de temps et d'argent non négligeable, et aussi économique, par exemple : l'utilisation d'un herbicide permet de désherber en quelque heure d'application, ce que l'homme mettrait plusieurs jours à faire mécaniquement. Damalas (2009), a également ajouté des avantages esthétiques, les consommateurs privilégiant les fruits et légumes sans défauts.

Au niveau de la santé humaine, les insecticides sont des outils très importants de la lutte contre certains vecteurs de maladies comme le paludisme (Gueddou A & Nedjaa Kh, 2017)

1.3-Consommation de produits phytopharmaceutiques

1.3.1- Chiffres clés sur la consommation

En 2008, les ventes de PPP en France atteignent la somme de 2,079 milliards d'euros, soit l'équivalent de 78 600 tonnes de matières actives, plaçant la France au rang de 4^{ème} consommateur mondial derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon (Figure 1), et de 1^{er} consommateur européen de PPP (Figure 2). Cependant, par sa consommation rapportée au nombre d'hectares cultivés (hors prairies permanentes), la France occupe le 3^{ème} rang européen avec 5,4 kg/ha/an (UIPP, 2010).

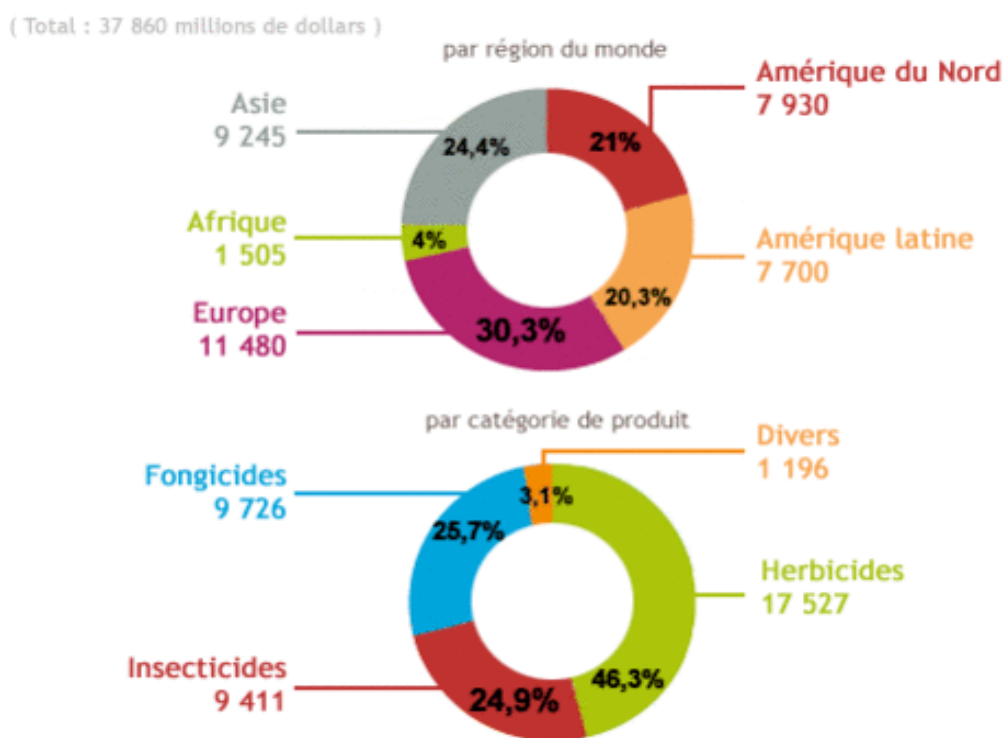


Figure 1 : Estimation de la consommation mondiale de PPP pour l'année 2009 par région du monde et par catégorie de produits (Consommation totale : 37860 millions de dollars). (UIPP, 2010).

1.3.2-Catégorie d'usage des pesticides

La plupart des pesticides peuvent être regroupés selon la cible qu'ils visent. Il est à noter que le suffixe -cide signifie « tuer ».

Tableau 1 : Catégorie d'usage des pesticides

Catégorie d'usage	Cibles visées	Exemples de cibles
Acaricide	Acariens	<ul style="list-style-type: none"> • Phytopte de l'érable • Tétranyque à deux points
Avicide	Oiseaux	<ul style="list-style-type: none"> • Pigeon
Fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Diplocarpon rosae</i> causant la tâche noire du rosier • <i>Pucciniastrum epilobii</i> causant la rouille des aiguilles du sapin • <i>Venturia inaequalis</i> causant la tavelure du pommier
Herbicide	Végétaux herbacés	<ul style="list-style-type: none"> • Chénopode • Chiendent • Herbe à la puce • Plantain
Insecticide	Insectes	<ul style="list-style-type: none"> • Blatte • Doryphore de la pomme de terre • Punaise velue • Tordeuse des bourgeons de l'épinette
Molluscicide	Mollusques terrestres	<ul style="list-style-type: none"> • Escargot • Limace
Nématocide	Nématodes causant des maladies des plantes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte
Phytocide	Espèces végétales herbacées et ligneuses	<ul style="list-style-type: none"> • Arbre à grand déploiement
Piscicide	Poissons	<ul style="list-style-type: none"> • Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	<ul style="list-style-type: none"> • Rat • Souris

D'autres pesticides comportent le suffixe –cide, soit les ovicides, les larvicides ou les adulticides, qui contrôlent respectivement l'œuf, la larve ou l'adulte d'un insecte. De plus, certains pesticides ont un nom se terminant par le suffixe –fuge signifiant « faire fuir », comme c'est le cas pour les insectifuges qui sont des répulsifs à insectes et les avifuges qui éloignent les oiseaux

Il existe d'autres catégories d'usage énumérées ci-dessous :

- médicament topique destiné aux animaux;
- peinture à émondage;
- peinture antisalissure;
- phéromone;
- préservateur du bois;
- régulateur de croissance des plantes;
- répulsif pour animaux.

1.4- Caractéristique générale des fongicides

Les fongicides agricoles permettent de combattre les champignons phytopathogènes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et les récoltes. Les pertes potentielles provoquées par les maladies fongiques sont estimées entre 10 et 30%. En dehors des effets quantitatifs, il existe des champignons pouvant affecter les qualités des productions végétales comme la présence de mycotoxines toxiques pour l'homme, ou des altérations organoleptiques comme la présence de *Botrytis cinerea* sur le raisin (Dorothee BATSCH., 2011).

Chapitre 02
Classification des fongicides

2.1-Classification des fongicides par mode d'action

Pour fonctionner, toute cellule animale ou végétale a besoin :

- **d'énergie**, grâce au processus respiratoire fournissant de l'ATP.
- **d'échanges avec le milieu extracellulaire** : la perméabilité membranaire permet de réguler les entrées et sorties d'eau et de substances nutritives à travers la membrane cellulaire.
- **de se diviser** : le phénomène de division cellulaire (mitose et méiose) permet la croissance et la reproduction de l'organisme (Dorothee BATSCH., 2011).

Toute atteinte à l'un de ces trois phénomènes vitaux va donc provoquer des perturbations dans la cellule, se traduisant par l'arrêt provisoire du fonctionnement de la cellule fongique (produit **fongistatique**) ou bien par la mort du champignon (produit **fongicide**). Ainsi il existe des fongicides affectant le processus respiratoire, des fongicides affectant la biosynthèse de chitine, des mélanines, des stérols, des acides nucléiques, et enfin des fongicides agissant sur les microtubules. (Dorothee BATSCH., 2011).

2.1.1- Fongicides affectant le processus respiratoire

Ces fongicides agissent sur différentes étapes du catabolisme oxydatif de molécules organiques (glucides, lipides), processus servant à générer de l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP (Figure 10). De nombreuses molécules affectent en particulier la chaîne respiratoire mitochondriale, constituée d'une série de transporteurs d'électrons. Ces molécules sont capables d'inhiber la germination des spores des champignons, de bloquer l'élongation du filament mycélien, et aussi d'immobiliser les zoospores des oomycètes (groupe comprenant les mildious).

Il existe des fongicides à effets multiples, dits multisites ; ceux-ci peuvent être minéraux ou de synthèse. A l'inverse d'autres fongicides n'agissent que sur une cible, ce sont des fongicides unisites. (Dorothee BATSCH., 2011).

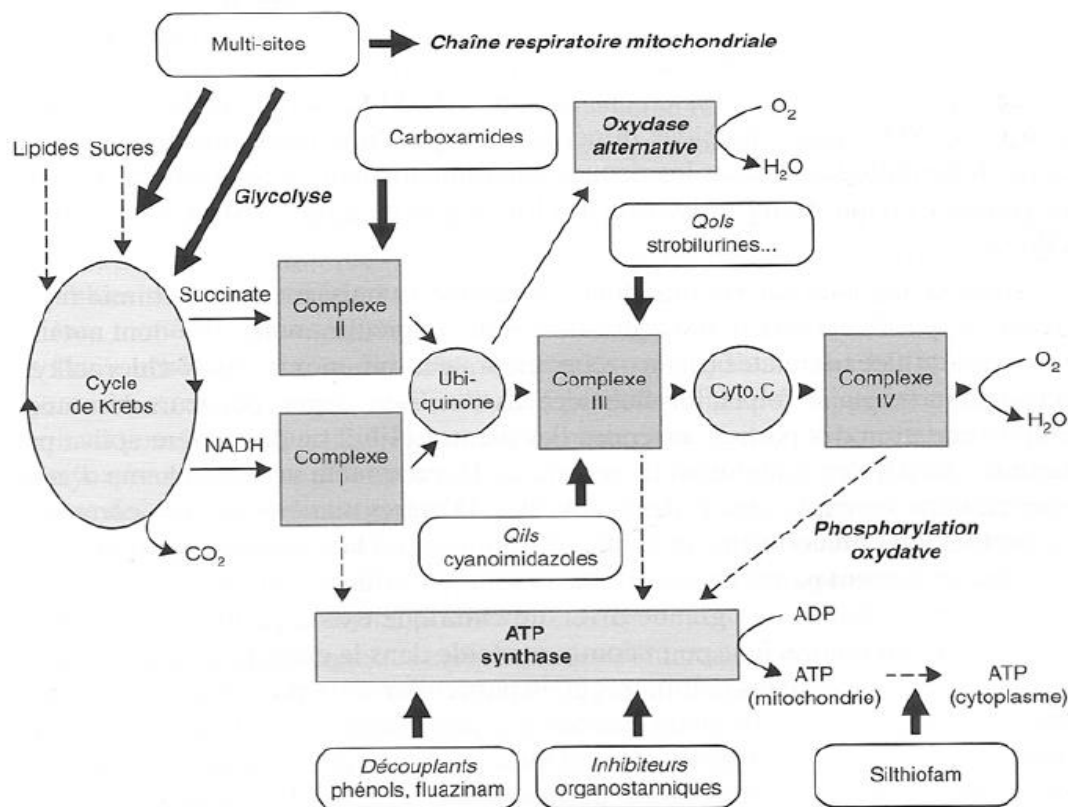


Figure 02 : Cible des fongicides affectant les processus respiratoires.(REGNAULTROGER C. et al, 2005).

-Fongicides multisites :

➤ *Fongicides minéraux*

Les fongicides multisites ont la capacité d'interagir avec de nombreux constituants cellulaires, en particuliers avec ceux possédant des groupements thiols ou -SH. Cet effet implique un blocage de la consommation d'oxygène, du catabolisme des substances de réserve des spores (lipides, sucres) et de la production d'énergie.

Parmi les fongicides multisites minéraux, le cuivre se complexe avec les groupements thiols des enzymes respiratoires du cycle de Krebs ainsi que sur les complexes II et III de la chaîne respiratoire, empêchant la production d'ATP (par exemple la coenzyme A déshydrogénase).

Le soufre a une action un peu différente, il pénètre dans les cellules fongiques, est réduit en dihydrogène sulfuré H₂S qui est un poison respiratoire mortel pour la cellule fongique. (Dorothee BATSCH., 2011).

➤ ***Fongicides de synthèse***

Ces fongicides regroupent les familles suivantes :

- les dithiocarbamates ; ceux-ci interagissent avec les enzymes respiratoires métalliques, il y a chélation entre le fongicide et le métal de l'enzyme respiratoire, formant des complexes de grande taille.
- les sulfénides ont un groupe thiophosgène qui interagit avec le groupement thiol des enzymes respiratoires.
- les quinones et les hydroxyquinones affectent également les processus respiratoires des cellules fongiques mais ont un mode d'action moins bien connu.

D'une manière générale, les fongicides multisites inhibent la germination des spores, corrélée avec l'inhibition de la respiration, due au blocage d'enzymes ou coenzymes à groupement thiols. Ils sont faiblement toxiques pour l'homme du fait de leur interaction avec le glutathion, qui conduit à leur dégradation.

-Fongicides unisites :

➤ ***Inhibiteurs du complexe II mitochondrial :***

Les crotonalinides (plus généralement les carboxamides) agissent sur la coenzyme Q réductase, qui est un des composant de la succinase déshydrogénase, enzyme du le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Dorothee BATSCH., 2011).

➤ ***Inhibiteurs du complexe III mitochondrial :***

Le complexe III ou cytochrome bc₁ assure au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale le transfert des électrons du coenzyme Q au cytochrome c. Il comporte une dizaine de protéines dont le cytochrome b, qui possède deux sites de fixation pour le coenzyme Q : l'un situé sur la face interne de la membrane mitochondriale (Q_i), et l'autre sur la face externe (Q_o). Suivant que les inhibiteurs du

complexe III mitochondrial se fixe sur le site interne ou externe, ils sont appelés respectivement QiI ou QoI.- 25 - Dans le groupe des QoI sont classés les familles des strobilurines, imidazolinones, et oxazolidinediones. Les strobilurines sont des molécules de synthèse inspirées de la strobilurine A, substance naturelle produite par un champignon forestier, *Strobilurus tenacellus*. Ces molécules ont fortement été utilisées, et de nombreuses résistances se sont développées face à elles. Dans le groupe des QiI se trouvent une cyanoimidazole, la cyasofamide. Aucune résistance n'a été décelée contre le produit. (Dorothee BATSCHE., 2011).

➤ **Fongicides affectant la biodisponibilité de l'ATP :**

Le silthiofam empêche le transfert de l'ATP des mitochondries vers le cytoplasme, mais a une action limitée à une seule souche fongique responsable du piétin-échaudage du blé.

Les agents découplant affectent la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire en perméabilisant les membranes mitochondriales aux protons. On trouve le fluazinam et le meptyldinocap. Le fluanizam est faiblement toxique pour les vertébrés, du fait de sa rapide détoxification par le glutathion.

2.1.2-Fongicides affectant les biosynthèses

- Fongicides affectant la constitution des parois

➤ *Inhibiteurs de la biosynthèse de la chitine :*

La famille des organophosphorés inhibent la chitine synthase présente chez les végétaux, mais agissent également comme insecticides car cette même hormone est présente chez les insectes.

➤ *Inhibiteurs de la biosynthèse de mélanines :*

Les mélanines sont des pigments noirs polyphénoliques synthétisés par de nombreux organismes dont les champignons. Certains champignons, avec un défaut de mélanisation, ne sont plus capables de produire d'hyphes permettant d'infecter les cellules épidermiques des plantes hôtes. Ces fongicides ont donc une activité anti-pénétrante. (Dorothee BATSCHE., 2011).

- Fongicides affectant la constitution des membranes

➤ *Inhibiteurs de la biosynthèse de stérols :*

Les stérols sont des composés essentiels des membranes cellulaires, dont ils régulent la fluidité. Les inhibiteurs de la biosynthèse de stérols (IBS) agissent à plusieurs niveaux :

- les inhibiteurs de la demethylase (DMI) (famille des imidazoles, pyridines, pyrimidines et triazoles) inhibent la C 14 déméthylase.

- les amines (morpholines et pipéridines) inhibent la C 8-7 isomérase, et/ou C 14 réductase.

- les hydroxyanilides inhibent la C 4 déméthylase.

L'élongation du filament mycélien ne peut pas se poursuivre, le champignon ne peut pas croître.

- Fongicides affectant la synthèse des acides nucléiques

Dans cette catégorie se trouvent des fongicides inhibant la biosynthèse d'ARN, soit par inhibition de l'ARN polymérase I (phénylamides) soit par inhibition de l'adénosine désaminase I (hydroxypyrimidines). Il existe également des produits bloquant la synthèse d'ADN (isoxazoles).

- Fongicides affectant la biosynthèse d'acides aminés

Le cyprodinil, le mépanipyrim et le pyriméthanil sont trois anilinopyrimidines efficaces notamment contre la pourriture grise et la tavelure des arbres fruitiers. Ces produits inhiberaient la biosynthèse de la méthionine. (Dorothee BATSCH., 2011).

- Fongicides affectant la biosynthèse de glucides

Les dicarboximides, le fludioxonil et le toclofos-méthyl (hétérocycles azotés) perturberaient l'osmorégulation, en entraînant une accumulation cytoplasmique de polyols (inositol, glycérol, mannitol). La cible serait une protéine kinase impliquée dans l'osmorégulation. Les hyphes des champignons atteints subissent des altérations physiologiques du type ramification, renflement, éclatement. (Dorothee BATSCH., 2011).

2.1.3-Fongicides agissant sur les microtubules

Les familles des benzamides, phénylcarbammates et benzimidazoles se fixent sur la β tubuline, empêchant la polymérisation de l' α avec la β tubuline. Les phénylurées agissent également sur les microtubules, mais la cible est inconnue.

Chez les champignons, les substances interférant avec la formation et le fonctionnement des microtubules entraînent un arrêt de l'élongation des hyphes et induisent d'importantes déformations.

En conclusion, les fongicides constituent un moyen efficace de lutte contre les maladies majeures des plantes cultivées. Cependant pour que ces produits puissent être encore utilisés, ils ne doivent pas présenter d'effets néfastes pour le manipulateur, le consommateur, et l'environnement. Du fait de leur interaction avec des cibles présentes aussi chez l'homme et les mammifères, certains produits, trop toxiques, ont été retirés du marché. Les nouvelles substances développées tendent donc à être sélectifs de cibles propres aux champignons, afin d'en limiter la toxicité.

Toutefois des phénomènes de résistance sont apparus ces dernières années, liés à l'utilisation accrue de certains fongicides (notamment les strobilurines), rendant désuète leur utilisation. (Dorothee BATSCH., 2011).

2.2-les fongicides SDHI

La famille des SDHI (inhibiteurs de la succinate déshydrogénase) ou carboxamides a été découverte il y a plus de 12 ans. Son premier emploi fut la protection des semences, puis celle du riz et des cultures spécialisées. Depuis 2006, elle est utilisée contre les pathogènes des céréales.

A ce jour en Algérie, Il y a deux substances fongicides de la famille des SDHI (***Boscalid***, ***Fluopyram***). Il s'agit du ***boscalid*** qui, associé à la ***pyrachlostrobine***, compose le produit commercial Bellis®.

Et un autre produit à base du ***boscalid***, associé à la ***krésoxim-méthyl*** .compose le produit commerciale Collis®.

Ce produit vise l'oïdium du pommier ainsi que les maladies de conservation.

La spécificité de cette famille est son mode d'action qui est différent de celui des autres familles chimiques uni-sites. Cette caractéristique est une force dans la stratégie de lutte contre la tavelure mais également un point faible. En effet, la cible de ces fongicides à base de carboxamides est la chaîne respiratoire des cellules de l'agent pathogène. Ils agissent sur la succinate déshydrogénase en l'inhibant ce qui entraîne une diminution de la production d'énergie et de métabolites indispensables au fonctionnement cellulaire. Ainsi le mycélium arrête son développement. Ce mode d'action uni-site est propre aux SDHI, ce qui risque fortement d'entraîner l'apparition de résistance à plus ou moins long terme s'il est fréquemment employé (AC, 2011).

Les trois substances actives issues de la famille des SDHI testées par le CEFEL ne font pas l'objet d'homologation en France (Marie-Neige HEBRARD, 2013).

La société Bayer a présenté lors de la conférence internationale sur les maladies des plantes, en décembre 2012 à Tour, sa nouvelle substance SDHI, le fluopyram. Ce fongicide est homologué en Suisse sur la tavelure des fruitiers à pépins et également sur d'autres maladies des cultures légumières et fruitière ainsi que ornementale (Marie-Neige HEBRARD, 2013)

En Algérie, Il y a deux produits de la famille des SDHI, Il s'agit du *Fluopyram* qui, sur le nom commercial *vellum prime* (Nématicides) et un autre produit à base du *Fluopyram*, associé à la *tébuconazole* compose le produit commerciale *Luna expérience*.

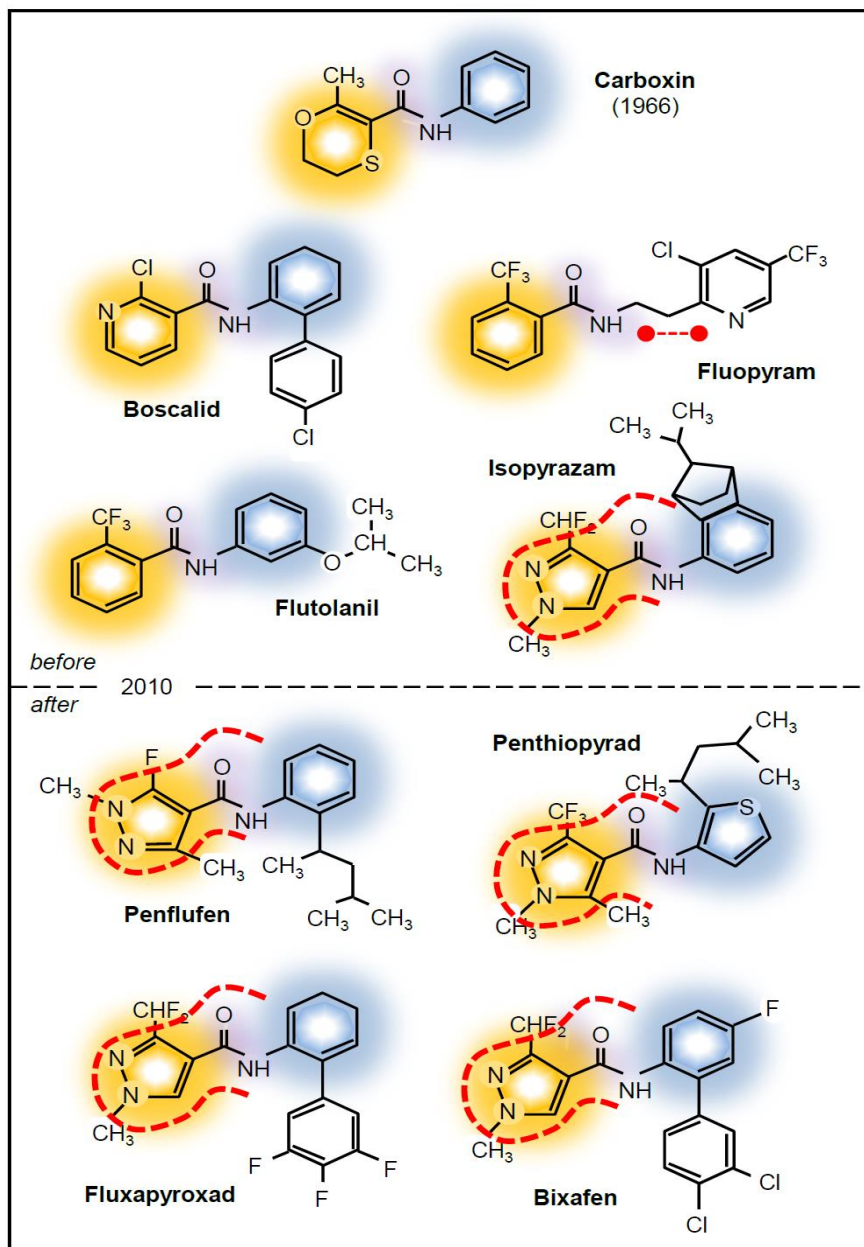


Figure. 3 Structure moléculaire des SDHI. Les parties jaunes et bleues de chaque molécule rappellent la structure de la carboxine, premier des SDHI (en haut). Les lignes pointillées rouges soulignent le fragment méthylpyrazol présent dans les différents SDHI de génération récente qui inhibent également le complexe III de la chaîne respiratoire. **Boscalid (DJA: 0,04 mg/kg/j)** introduit en 2003 aux États-Unis par BASF, **fluopyram (DJA: 0,012 mg/kg/j)** en 2010 aux États-Unis par Bayer, flutolanil (0,09 mg/kg/j) dans 1981 aux États-Unis par Nichino America, penflufen (DJA: 0,04 mg/kg/j) en 2012 aux États-Unis par Bayer, isopyrazam (DJA: 0,03 mg/kg/j) en 2010 en Angleterre par Syngenta, penthiopyrad (DJA: 0.1 mg/kg/j) en 2011 aux États-Unis par Dupont-Fontelis, fluxapyroxad (DJA: 0,02 mg/kg/j) en 2011 en France par BASF, et bixafen (DJA: 0,02 mg/kg/j) en 2011 en Angleterre par Bayer. DJA; Dose Journalière Acceptable, conformément à la réglementation européenne. (Plos one 2019)

Chapitre 03
Les effets des pesticides et les
substances SDHI.

3.1-Liste des substances SDHI et des usages autorisés

D'après le FRAC, 18 substances actives évaluées en Europe, appartiennent à la famille des SDHI. Il s'agit d'une famille assez récente, la plupart des substances actives (hors boscalid, carboxine et flutolanil) ayant été approuvées après 2013. Douze de ces substances sont actuellement approuvées en Europe. Quatre substances SDHI ne sont plus approuvées en Europe depuis 2002 : benodanil, fenfuram, mepronil, oxycarboxin. Le furametpyr et le thiflumazide ne sont pas référencés dans la base européenne de la Commission européenne sur les SA autorisées pour une utilisation en tant que produit phytopharmaceutique (PPP) (Anses, 2019).

Tableau 2: Liste des substances actives SDHI approuvées en (Anses, 2019).

Liste SDHI (source : FRAC)	Principaux types d'usages	Date de la dernière de approbation de la SA.	Date de la 1 ^{ère} autorisation d'un PPP contenant la SA
benzovindiflupyr	Traitement des parties aériennes : céréales	03/2016	11/2016
bixafen	Traitement des parties aériennes : céréales	10/2013	08/2011
boscalid	Traitement des parties aériennes : céréales, vigne, arboriculture, crucifères oléagineux, tournesol, légumes	08/2008	06/2005
carboxine	Traitement de semences	06/2011	12/1968
fluopyram	Traitement des parties aériennes : céréales, arboriculture, cultures légumières, oléagineux, banane	02/2014	10/2013
flutolanil	Traitement de semences : pomme de terre	09/2009	06/1992
fluxapyroxad	Traitement de semences et des parties aériennes : céréales, arboriculture, légumes	01/2013	10/2011
isofetamid	Traitement de semences et des parties aériennes : vigne, arboriculture, fraise, crucifères oléagineux	09/2016	08/2018
isopyrazam	Traitement parties aériennes ornementales	04/2013	12/2017
penthiopyrad	Traitement des parties aériennes : céréales et tomates	05/2014	11/2014
sedaxane	Traitement de semences : céréales et maïs	02/2014	07/2011

3.2--Données de vente, d'utilisation et de vigilance concernant les SDHI

3.2.1- Données de vente et d'utilisation

La banque nationale des ventes des produits phytopharmaceutiques par les distributeurs (BNVD²⁰) ainsi que les enquêtes Pratiques culturelles du Ministère en charge de l'agriculture permettent de collecter des données de vente et d'utilisation.

Le boscalid est la substance de la famille des SDHI la plus vendue. Elle se situe aujourd'hui au 49^{ème} rang des ventes de substances entrant dans la composition des PPP, avec un tonnage annuel vendu de près de 250 tonnes chez les professionnels en 2016. Ce tonnage est toutefois en diminution puisqu'il était de 600 tonnes par an en 2009 (22^{ème} rang de vente).

En termes de pratiques culturelles, le boscalid est appliqué au moins une fois sur près de 80% des surfaces de colza (données 2014), 51% des surfaces en carottes (données 2013), environ 30% des surfaces en fraises, salades (données 2013) et pommes (données 2012), environ 20% des surfaces en vigne (données 2014), melons et poireaux (données 2013). À noter que pour le blé tendre et l'orge, près de 30% des surfaces étaient traitées au moins une fois au boscalid en 2011 contre environ 10% lors de l'enquête de 2014. À l'inverse, 11% des vignes étaient traitées au moins une fois au boscalid en 2011 contre 22% en 2014. (Anses, 2019)

Les tonnages de vente de la carboxine et du flutolanil sont plus faibles et, comme pour le boscalid, en diminution :

- carboxine : 43,2 tonnes (121^{ème} rang) contre 76,4 tonnes en 2012
- flutolanil : 4,6 tonnes (218^{ème} rang) contre 13,1 tonnes en 2009.

Pour ces substances, il n'est pas observé de surfaces traitées dans les enquêtes pratiques culturelles. Ce résultat s'explique par le fait que ces enquêtes n'étudient pas le recours aux traitements de semences qui sont les principaux usages autorisés pour ces substances.

Pour les substances plus récemment autorisées (à partir de 2013), les ventes sont en augmentation, sans toutefois atteindre celles du boscalid. Par ordre décroissant de vente, on observe ainsi :

- fluxapyroxad : 145 tonnes en 2016 (69^{ème} rang) contre 113 tonnes en 2013, associé à 38% des surfaces en blé tendre traitées au moins une fois en 2014 et 24% des surfaces en orge la même année. (Anses, 2019)

bixafen : 90 tonnes en 2016 (86^{ème} rang) contre 82 tonnes en 2013, associé à 38% des surfaces en orge traitées au moins une fois en 2014 et 22% des surfaces en blé tendre la même année.

- fluopyram : 60 tonnes en 2016 (106^{ème} rang) contre 10 tonnes en 2014

- sedaxane : 20 tonnes en 2016 (154^{ème} rang) contre 13 tonnes en 2013

- benzovindiflupyr : 656 kg en 2016 (281^{ème} rang) contre 0 en 2015

- penthiopyrad : 432 kg en 2016 (291^{ème} rang) contre 0,4 kg en 2015.

Pour ces quatre dernières substances, il n'est pas observé de surfaces traitées dans les enquêtes pratiques culturales. Les données les plus récentes disponibles de ces enquêtes sur les grandes cultures datent de 2014. (Anses, 2019)

3.2.2- Données de phytopharmacovigilance

Les données discutées ci-après sont issues de la phytopharmacovigilance. La méthodologie employée pour collecter ces données est disponible dans la *notice explicative des fiches de synthèse des données de surveillance et de vigilance par substance active* (Anses, Novembre 2017).

3.3.2.1- Denrées alimentaires destinées à la consommation humaine

Les données concernent la France et les trois dernières années les plus récentes disponibles, de 2013 à 2016.

Pour le boscalid : cette substance est recherchée dans près de 5000 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution. Les taux de quantifications sont compris entre 4,4 et 8,7% selon les années. De 110 à 150 types de denrées alimentaires sont analysés. Il n'est pas observé de dépassement des LMR. (Anses, 2019)

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 1200 et 2700 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 69 à 77 types de denrées alimentaires. S'agissant de denrées directement à la production, les taux de quantification sont plus élevés (entre 9,2% et 12,7%) sans entraîner de dépassement de LMR au cours des dernières années.

Dans l'EAT2, 611 analyses de boscalid ont été réalisées, avec un taux de quantification de 3,1% sans dépassement de LMR. Dans l'EATi, 305 analyses ont été réalisées, avec un taux de quantification de 1,6% sans dépassement de LMR. (Anses, 2019)

Pour le flutolanil : cette substance est recherchée dans près de 5000 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution. Les taux de quantifications sont de 0,02%. De 109 à 139 types de denrées alimentaires sont analysés. Il n'est pas observé de dépassement des LMR (sauf pour une carotte en 2015).

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 1200 et 2600 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 65 à 70 types de denrées alimentaires. Les taux de quantification sont inférieurs à 0,7% sans entraîner de dépassement de LMR au cours des dernières années.

Dans l'EAT2, 313 analyses de flutolanil ont été réalisées, sans quantification observée. Dans l'EATi, 296 analyses ont été réalisées, sans quantification observée.

Pour la carboxine : cette substance est recherchée dans 2200 à 4500 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution, sans quantification. De 109 à 119 types de denrées alimentaires sont analysés.

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 800 et 1400 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 50 à 61 types de denrées alimentaires. Une seule quantification est observée sans entraîner de dépassement de LMR au cours des dernières années.

Dans l'EAT2, 211 analyses de carboxine ont été réalisées, sans quantification observée. Dans l'EATi, 135 analyses ont été réalisées, sans quantification observée. (Anses, 2019)

Les autres substances ne sont pas recherchées dans l'EAT2 et l'EATi compte tenu d'approbation plus récente (bixafen, fluxapyroxad, fluopyram, sedaxane, penthiopyrad, benzovindiflupyr). Elles le sont à des degrés variables, dans les programmes de surveillance et de contrôle : Pour le boscalid : cette substance est recherchée dans près de 5000 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution. Les taux de quantifications sont compris entre 4,4 et 8,7% selon les années. De 110 à 150 types de denrées alimentaires sont analysés. Il n'est pas observé de dépassement des LMR.

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 1200 et 2700 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 69 à 77 types de denrées alimentaires. S'agissant de denrées directement à la production, les taux de quantification sont plus élevés (entre 9,2% et 12,7%) sans entraîner de dépassement de LMR au cours des dernières années.

Dans l'EAT2, 611 analyses de boscalid ont été réalisées, avec un taux de quantification de 3,1%²⁴ sans dépassement de LMR. Dans l'EATi, 305 analyses ont été réalisées, avec un taux de quantification de 1,6% sans dépassement de LMR.

Pour le flutolanil : cette substance est recherchée dans près de 5000 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution. Les taux de quantifications sont de 0,02%. De 109 à 139 types de denrées alimentaires sont analysés. Il n'est pas observé de dépassement des LMR (sauf pour une carotte en 2015).

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 1200 et 2600 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 65 à 70 types de denrées alimentaires. Les taux de quantification sont inférieurs à 0,7% sans entraîner de dépassement de LMR au cours des dernières années.

Dans l'EAT2, 313 analyses de flutolanil ont été réalisées, sans quantification observée. Dans l'EATi, 296 analyses ont été réalisées, sans quantification observée.

Pour la carboxine : cette substance est recherchée dans 2200 à 4500 analyses réalisées tous les ans sur des denrées prélevées à la distribution, sans quantification. De 109 à 119 types de denrées alimentaires sont analysés. (Anses, 2019)

Cette substance est également analysée sur des denrées directement à la production avec entre 800 et 1400 analyses réalisées tous les ans, correspondant à 50 à 61 types de denrées alimentaires. Une seule quantification est observée sans entrainer de dépassement de LMR au cours des dernières années. Dans l'EAT2, 211 analyses de carboxine ont été réalisées, sans quantification observée. Dans l'EATi, 135 analyses ont été réalisées, sans quantification observée.

Les autres substances ne sont pas recherchées dans l'EAT2 et l'EATi compte tenu d'approbation plus récente (bixafen, fluxapyroxad, fluopyram, sedaxane, penthiopyrad, benzovindiflupyr). Elles le sont à des degrés variables, dans les programmes de surveillance et de contrôle : (Anses, 2018)

- le bixafen et le fluopyram sont recherchés à la distribution (entre 2200 et 4800 analyses par an) et à la production (entre 400 et 1800 analyses par an) avec un taux de quantification inférieur à 2,5%. Un dépassement de LMR sur kiwi a été observé pour le fluopyram.
- le fluxapyroxad est recherché dans les denrées à la distribution (entre 2200 et 4500 analyses par an) et à la production (300 à 960 analyses par an), sans quantification.
- le penthiopyrad et le benzovindiflupyr sont recherchés uniquement dans les denrées à la production et en 2016 (respectivement 551 et 187 analyses par an), sans quantification.
- le sedaxane n'est pas recherché dans les données 2013-2016 disponibles.

3.3.2.2- Eaux de surface

S'agissant de la présence des substances de la famille des SDHI dans les eaux de surface, le boscalid se démarque des autres substances. Pour la métropole, le boscalid est recherché sur 52% à 62% des points de mesures du réseau de surveillance, soit 11 000 à 16 000 analyses par an. Les taux de quantification varient de 11% à 18% sans dépassement de la PNEC. Un facteur de plus de 600 est observé entre la PNEC aquatique et les moyennes de contamination les plus élevées observées.

flutalonil et la carboxine sont également recherchés dans les eaux de surface sur 29% à 67% des points de mesure, soit 8 000 à 15 000 résultats analytiques par an, avec des taux de quantification faibles, inférieurs à 0,2% et sans dépassement de la PNEC. Des facteurs de plus de 600 et 1200 sont observés entre la PNEC et les moyennes de contamination les plus élevées, respectivement pour la carboxine et le flutolanil. (Anses, 2014).

Il n'y a pas de données disponibles dans les DROM pour ces substances.

Le fluxapyroxad et le bixafen sont très peu recherchés (moins de 2% des points de mesure du réseau de surveillance correspondant au plus à 300 analyses par an), avec une seule quantification pour le fluxapyroxad en 2015, sans dépassement de la PNEC. Ces substances sont associées à des PNEC inférieures à celle du boscalid d'un facteur respectivement 4 pour le fluxapyroxad et 27 pour le bixafen. Pour le fluopyram, le sedaxane, le penthiopyrad et le benzovindiflupyr, il n'y a pas de données de surveillance dans les eaux de surface. (Anses, 2014).

3.3.2.3-Eaux destinées à la consommation humaine et eaux souterraines

Les non-conformités sont analysées au regard du dépassement du seuil de qualité réglementaire de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ en vigueur dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Dans les eaux destinées à la consommation humaine pour la période 2007-2016 :

- Pour le boscalid : plus de 5000 analyses sont réalisées tous les ans, avec un taux de quantification inférieur à 0,6%, et 4 non-conformités depuis 2014.
- Pour le flutolanil et la carboxine, environ 1500 analyses sont réalisées tous les ans, associées à une quantification depuis 2014 sans non-conformité.
- Le fluxapyroxad et le bixafen sont très peu recherchés (30 analyses par substances en 2016), sans quantification.
- Les autres substances ne sont pas recherchées (fluopyram, sedaxane, penthiopyrad, benzovindiflupyr).

Pour les eaux souterraines, les résultats disponibles sont analysés sur la période 2014-2016.

- Plus de 15 000 résultats d'analyses sont disponibles pour le boscalid, avec un taux de quantification de 5%. Le taux de non-conformité est de 0,4%.
- Pour le flutolanil, plus de 8 000 résultats d'analyses sont disponibles avec un taux de quantification de 0,1% et sans non-conformité observée.
- La carboxine et le bixafen sont recherchés (respectivement plus de 7 000 et 4 400 résultats d'analyses), avec une seule quantification pour le bixafen.
- Enfin, les autres substances ne sont pas recherchées (fluxapyroxad, fluopyram, sedaxane, penthiopyrad, benzovindiflupyr). (Anses, 2014).

3.3.2.4-Evaluation des risques alimentaires pour le consommateur

Les expositions aux résidus de produits phytopharmaceutiques sont calculées à partir des données de poids corporel, de consommations alimentaires et de teneurs de résidus dans les aliments recueillis par les plans de surveillance et de contrôle (Anses, 2014) ou des études de l'alimentation totale (EAT).

Pour le boscalid, sur la base des données disponibles, il n'a pas été observé de dépassements des valeurs toxicologiques de référence chronique ou aiguë. Selon un scénario maximaliste, l'exposition

chronique représente au plus 1,2% de la DJA, avec un taux de couverture du régime alimentaire compris entre 60% et 95%.

Pour le flutolanil, sur la base des données disponibles, il n'a pas été observé de dépassements des valeurs toxicologiques de référence chronique ou aiguë. Selon un scénario maximaliste, l'exposition chronique représente au plus 0,2% de la DJA, avec un taux de couverture du régime alimentaire compris entre 65 et 92%. Pour l'EAT2, les analyses disponibles ne permettent pas de couvrir de manière satisfaisante l'ensemble du régime alimentaire et donc d'estimer les risques pour le consommateur.

Pour la carboxine, les analyses disponibles ne permettent pas de couvrir de manière satisfaisante l'ensemble du régime alimentaire et donc d'estimer les risques pour le consommateur.

Les risques alimentaires, évalués dans les dossiers d'AMM, n'ont à ce jour pas été évalués par cette approche complémentaire basée sur les mesures disponibles pour les autres substances (fluxapyroxad, bixafen, fluopyram, sedaxane, penthiopyrad, benzovindiflupyr) en raison de leur introduction plus récente sur le marché national et de la durée nécessaire à la réalisation des plans de surveillance et de contrôle (Anses, 2019).

3.3.2.5-Air ambiant

Seul le boscalid est recherché au cours des trois dernières années disponibles (2013 à 2015), avec un taux de quantification inférieur à 1% estimé à partir de 250 à 320 analyses par an.

Dans le cadre du travail d'expertise relatif à la définition de modalités de surveillance des pesticides dans l'air, les substances SDHI ont fait l'objet d'un travail de priorisation. Seul le boscalid a été identifié comme prioritaire en vue d'une surveillance nationale des pesticides dans l'air (Anses, 2017).

3.3.2.6-Cas d'intoxication en santé animale (faune sauvage et animaux domestiques)

Sur la base des données disponibles (données ONCFS, au 31/12/2013), il n'a pas été montré d'effets aigus sur la faune sauvage. Par ailleurs, malgré une exposition potentielle au boscalid et au flutolanil, ces substances n'ont pas été détectées dans les mesures d'imprégnation d'oiseaux granivores ou de leurs œufs non éclos dans des plaines de grande culture.

Concernant les animaux domestiques (données CAPAE-OUEST, au 31/12/2017), les appels relatifs aux fongicides SDHI reçus par le CAPAE-Ouest sont peu nombreux (boscalid : 1, carboxine : 7, fluopyram : 1, sedaxane : 2), et sont liés le plus souvent à l'ingestion de semences traitées (notamment par des chiens). C'est pourquoi ils sont plus fréquents à la période des semis d'automne. L'intoxication n'a été jugée *Probable* pour aucun des appels reçus, et cela peut s'expliquer le plus souvent par :

- une toxicité de ces matières actives peu spécifique,
- une utilisation des substances généralement en association,
- des doses ingérées inconnues,
- une ingestion de semences qui peut être en cause également dans les troubles observés.

3.3.2.7.1- Mortalités massives aiguës

Entre 2012 et 2016, 660 déclarations de mortalités d'abeilles ont été reçues dans le cadre de la surveillance des mortalités massives aiguës et des maladies, classées dangers sanitaires de première catégorie des abeilles sur l'ensemble du territoire. Sur les 27 enquêtes ayant conclu à une intoxication à une ou plusieurs substances actives, aucune mortalité n'a été imputée aux SDHI. (Anses, 2019).

2.4.7.2 Contamination des matrices apicoles

Sur la base des données disponibles (données ITSAP – au 22/06/2018), **le boscalid et le fluopyram** ont été retrouvés dans les matrices apicoles, principalement dans le pollen de trappe.

Tableau 3 : Concentrations en boscalid dans les matrices apicoles (exprimées en mg/kg) (Anses, 2019).

Résultats	Pollen de trappe	Pain d'abeille	Miel
nombre d'analyses	1007	356	109
LOQ	0,02	0,02	0,02
occurrence de détection	161	2	1
fréquence de détection (%)	16	0,6	0,9
occurrence de quantification	101	1	1
fréquence de quantification (%)	10	0,3	0,9
concentration moyenne	0,169	-	-
concentration maximale	3,2	0,026	0,04
concentration médiane		0,057	
P5		0,024	
P95		0,544	

Tableau 4 : Concentrations en Fluopyram dans les matrices apicoles (exprimées en mg/kg) (Anses, 2019).

Résultats	Pollen de trappe
nombre d'analyses	1007
LOQ	0,01
occurrence de détection	50
fréquence de détection (%)	5
occurrence de quantification	24
fréquence de quantification (%)	2,4
concentration maximale	0,278

La contamination des échantillons de pollen de trappe collecté par les abeilles s'étend sur l'ensemble de la saison de suivi des colonies, du mois d'avril au mois de septembre pour le boscalid. Pour le fluopyram, la contamination s'étend du mois d'avril au mois de juin. Les deux substances sont principalement retrouvées dans les ruchers autours desquels la vigne est plus fortement représentée. (Anses, 2019).

3.4- Fixation de la limite maximale de résidus (LMR)

La définition de résidu a été précisée par la Directive 90/642/CE du 27 novembre 1990, puis traduite en droit français par l'arrêté du 5 août 1992 qui applique ce terme non seulement aux reliquats de la substance active, mais aussi, le cas échéant, aux produits de métabolisation, de dégradation ou de réaction.

La **LMR** est un paramètre réglementaire que l'on pourrait assimiler à la quantité maximale de résidu d'un produit donné qui ne doit pas être dépassée dans une denrée alimentaire donnée. Elle est proposée

par le pétitionnaire dans le dossier d'homologation à partir d'études réalisées sur chaque culture pour laquelle un usage est sollicité, dans des conditions d'application et de prélèvements correspondants aux Bonnes Pratiques Agricoles Critiques, en nombre suffisant, bien dispersés dans le temps et dans l'espace. Après évaluation des résultats de ces études, un calcul statistique permet d'obtenir une LMR pour chaque culture faisant l'objet d'une autorisation d'usage.

Les Limites Maximales de Résidus (LMR) sont fixées à partir d'essais conduits selon les Bonnes Pratiques agricoles et les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Pour chaque culture proposée à l'homologation, les études de résidus doivent être conduites selon des exigences européennes précisément définies et très strictes (Aprifel, 2020)

3.5-La dose journalière admissible (DJA)

La DJA est la dose qu'un individu peut ingérer chaque jour pendant toute sa vie sans qu'il en résulte d'inconvénient pour sa santé. Elle s'exprime en poids de substance par unité de poids corporel (ex : mg/kg). Elle est bien évidemment déduite d'expérimentations animales qui permettent de déterminer une DJA chez l'animal. Cette valeur est extrapolée à l'Homme par application d'un premier facteur de sécurité fixé à 10 (changement d'espèce animal / homme) puis d'un deuxième facteur de sécurité également fixé à 10 et qualifié d'intra-spécifique pour tenir compte de l'extrême variabilité individuelle de l'espèce humaine.

La DJA chez l'Homme est donc déduite de la DJA établie chez l'animal en divisant cette dernière par un facteur de sécurité de 100, lequel n'est pas immuable puisqu'il est modulable en fonction des données scientifiques. Il n'est pas rare du tout de voir ce facteur porté à 500 par exemple si le produit présente une forte toxicité, à 1500 si le produit possède des propriétés mutagènes et même à 5000 s'il y a un doute sur sa non-cancérogénicité (Aprifel, 2020).

PARTIE II: EXPERIMENTATION :
Résumes

1 Intitulé : Sensibilité de la chaîne respiratoire mitochondriale aux pesticides SDHI et conséquence sur les cellules humaines en culture. (PLOS One, janvier 2019) (Annexe 1)

1.1. Résumé :

Les Inhibiteurs de la Succinate DésHydrogénase (**SDH**) (**SDHI**) sont utilisés dans le monde entier pour limiter la prolifération de moisissures sur les plantes et leurs produits. Toutefois, la SDH, également appelé complexe II de la chaîne respiratoire, est un composant universel des mitochondries qui sont présentes dans quasi tous les organismes vivants.

La SDH est restée particulièrement conservée au cours de l'évolution, et l'on peut légitimement s'interroger sur la spécificité des SDHI vis-à-vis des seules moisissures. Ici, nous établissons d'abord que la SDH de l'homme, de l'abeille domestique, du ver de terre et des champignons sont toutes sensibles aux huit SDHI testés, avec toutefois des valeurs d'IC50 variables, généralement de l'ordre de la micro-molaire.

Nous avons ensuite observé que cinq des SDHI, principalement de la dernière génération, inhibent, outre la SDH, l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire. Puis, nous montrons que le glucose présent dans les milieux de culture cellulaire masque totalement l'effet délétère des SDHI. En effet, le glucose métabolisé par la glycolyse va fournir suffisamment d'ATP et de pouvoir réducteur (NADPH) pour les enzymes antioxydantes et ainsi permettre la croissance de cellules déficientes en chaîne respiratoire. En revanche, lorsque la glutamine est la principale source de carbone au lieu du glucose, la présence de SDHI entraîne une mort cellulaire dépendante du temps. Ce processus est considérablement accéléré pour des fibroblastes provenant de patients atteints de maladies neurologiques ou neurodégénératives dues à une altération de la chaîne respiratoire (encéphalopathie due à un déficit partiel de SDH) et/ou à une hypersensibilité aux stress oxydatifs (ataxie de Friedreich, forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer).

1.2.Introduction :

L'utilisation agricole des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) et les conséquences potentielles sur la santé des professionnels exposés d'une part et d'autre part des consommateurs posent un certain nombre de questions concernant leur impact potentiel sur la santé humaine, au regard de l'absence de spécificité de ces molécules vis-à-vis des champignons.

Les SDHI sont maintenant largement utilisés dans l'agriculture à travers le monde pour lutter contre la prolifération des moisissures. Ces composés sont utilisés sur les cultures de céréales; pour la conservation des fruits, des légumes et des graines, pour l'entretien des pelouses des terrains de sport et des golfs. Toutefois, en raison de la fonction quasi universelle de la SDH dans la respiration cellulaire et le métabolisme mitochondrial, on peut supposer que tout organisme vivant exposé à ces substances pourrait également être affecté. De fait, l'exposition aux SDHI sur les organismes non ciblés pourrait se révéler un problème majeur, et parmi d'autres facteurs, jouer un rôle capital dans la perte de biodiversité déjà constatable dans une grande partie du monde. De tels effets vont dépendre de la sensibilité de la SDH aux SDHI, qui peut varier légèrement en fonction des SDHI et des espèces. Le moment, la fréquence, la durée de l'exposition au SDHI, leur absorption et leur métabolisation ainsi que l'utilisation éventuelle de substances toxiques supplémentaires sont des facteurs évidents à prendre en compte, outre la dose proprement dite, bien souvent seule considérée (dose journalière admise ; DJA).

Cette lacune nous a incité à étudier les effets de huit différents SDHI, y compris de la dernière génération de molécules, sur l'activité de la SDH. Et, plus généralement, sur les activités de la chaîne respiratoire mitochondriale chez quatre espèces différentes: *Botrytis Cinerea*, en tant qu'organisme cible, *Homo sapiens*, *Lumbricus terrestris* et *Apis mellifera*, toutes espèces non ciblées. Outre l'effet général, quoique variable, des SDHI testés sur les SDH de différentes espèces, nous avons observé que plusieurs des SDHI de dernière génération inhibaient également le complexe III (CIII) de la chaîne respiratoire en plus de la SDH (CII), indiquant la liaison potentielle de ces SDHI à d'autres sites de liaison des quinones dans la cellule. Nous avons finalement montré que, dans des conditions de culture

non permissives pour les cellules déficientes en chaîne respiratoire, ces inhibiteurs altéraient et la croissance et, finalement, la survie des cellules humaines, lorsque celles-ci sont traitées avec des SDHI, probablement à cause du stress oxydatif engendré par ces SDHI.

1.3-Matériel et méthodes :

Quatre types de matériels biologiques, à savoir le champignon *Botrytis cinerea*, l'abeille *Apis mellifera*, le ver de terre *Lumbricus terrestris*, et des cellules humaines en culture ont été utilisés pour tester l'effet des SDHI sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Afin d'éviter toute interférence avec d'éventuelles activités contaminants et de maintenir des conditions expérimentales similaires pour la mesure des activités de la chaîne respiratoire, différentes méthodes de préparation ont dû être utilisées pour les cellules en culture, les organismes entiers et les tissus.

➤ *Botrytis cinerea*

La population mixte de *B. cinerea* utilisée dans cette étude a été gracieusement fournie par Joelle Dupont (Musée National d'Histoire Naturelle, Paris, France). Les conidies de *B. cinerea* ont été obtenues à partir d'une culture sur plaques de gélose additionnée de malt (15 à 30 jours). Des colonies mycéliennes ont été préparées, à partir de 10 colonies, en milieu liquide (10 g glucose, 2 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 1 g (NH₄)₂SO₄, 2 g d'extrait de levure et de l'eau déionisée jusqu'à 1 l, pH 6,2). L'incubation a été réalisée à 23°C jusqu'à ce que les hyphes recouvrent totalement la surface de la bouteille. Les hyphes (disques de 9 cm de diamètre) ont été récoltés, lavés deux fois avec de l'eau distillée réfrigérée et enfin avec un milieu d'extraction des mitochondries contenant du Tris 20 mM (pH 7,2), du saccharose 0,25 M, du KCl 40 mM, de l'EGTA 2 mM, 1 mg/ml BSA, sans cystéine. Les hyphes ont été suspendus dans 150 ml de milieu d'extraction, coupés en petits morceaux (1 cm²), puis homogénéisés à grande vitesse pour 1x2 sec et à basse vitesse pour 2x3 sec à l'aide d'un mixeur Multi Moulinex (Moulinex, France). L'homogénat a ensuite été filtré à travers deux couches de tissu de nylon (mailles 150 µm). Le tissu a été lavé avec 50 ml de milieu d'extraction. Après centrifugation à basse vitesse (700 g x 15 min), les mitochondries ont été recueillies à 10 000 g x 20 min. Le culot a été remis en suspension dans 250 µl de milieu d'extraction (aliquotes ±30 µl) et maintenu congelé à -80°C.

➤ ***Apis mellifera* :**

Les abeilles (*Apis mellifera* ; n=5) ont été amicalement offertes par Jacques Kemp (apiculteur; Saint-Rémy-lès-Chevreuse, Yvelines, France). Les corps entiers, congelés au contact de glace carbonique, à l'exception des têtes, ont été homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem en verre de 1 ml dans un milieu glacé constitué de Tris 20 mM (pH 7,2), saccharose 0,25 M, KCl 40 mM, 2 mM EGTA, 1 mg/ml de BSA. L'homogénat a été centrifugé à 1500 g x 5 min. Les mitochondries contenues dans le surnageant ont été centrifugées à 10 000 g x 10 min. Le culot de mitochondries brutes a été aliquoté ($\pm 20 \mu\text{l}$) et maintenus congelés à -80°C .

➤ ***Lumbricus terrestris* :**

Des lumbrics, *Lumbricus terrestris* ont été collectés (n=5) dans un compost domestique à Epernon (France 28230) et identifiés par la lombricultrice (Paule Bénit) chargée de ce compost. Avant utilisation, les vers ont été lavés 5 fois avec une solution 1x de phosphate salin, tamponnée. Un homogénat frais a été préparé à partir des segments situés entre le prostomium et le clitellum des 5 individus. Les tissus ont été placés dans 500 μl d'un milieu glacé constitué de Tris 20 mM (pH 7,2), de saccharose 0,25 M, de KCl 40 mM, d'EGTA 2 mM et de 1 mg/ml de BSA, et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem en verre de 1 ml. Une centrifugation à basse vitesse à 1500 g x 5 min a permis d'éliminer les débris lourds. Le surnageant a été distribué en aliquotes de 50 μl et maintenu congelé à -80°C .

➤ **Cultures de fibroblastes humains et cellules HEK :**

Les fibroblastes cutanés sont issus de biopsies de l'avant-bras obtenues avec le consentement éclairé de contrôles sains et de trois patients présentant soit une encéphalopathie due à un déficit en SDH, soit une ataxie de **Friedreich** (FRDA), soit une maladie familiale d'**Alzheimer** (FAD). Le patient déficitaire en SDH présentait un syndrome de Leigh résultant d'une mutation homozygote de la sous-unité flavoprotéique de la SDH (mutation R554W de la SDHA) (encadré 2). Les fibroblastes FRDA provenaient d'une patiente présentant une longue expansion bi allélique de triplets GAA ($> 2,6 \text{ kb}$) dans le gène de la frataxine (FXN) (patient FRDA4). Cette expansion entraîne l'inactivation des gènes FXN et PIP5K1B. La perte de fonction de $\text{PIP5K1}\beta$ entraîne une diminution des niveaux de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Ceci résulte en une déstabilisation du réseau d'actine et une altération de la signalisation du superoxyde dismutase (SOD) par la voie Keap1-Nrf2 [19,21] et finalement l'incapacité d'éliminer normalement

les superoxydes [21,22]. Les fibroblastes FAD proviennent d'un patient de sexe masculin cliniquement affecté par le syndrome FAD (origine Coriell Institute; AG08064). Ces fibroblastes FAD présentent également des anomalies dans la voie Nrf2 contrôlant la signalisation de la SOD [23] et sont aussi très sensibles aux agressions oxydatives [24,25].

Les cellules ont été cultivées dans des flacons T75 en utilisant 10 ml de milieu DMEM contenant 1 ou 4,5 g/l de glucose, 4 mM de glutamine (Glutamax; Gibco Thermo Fisher Scientific, MA), 2 mM de pyruvate et 200 μ M d'uridine (ci-après dénommé milieu permissif GlucoMax) ou sans glucose, pyruvate et uridine, mais contenant 4 mM de glutamine (ci-après dénommé milieu non permissif MitoMax ; tableau 1). Tous les milieux ont été supplémentés avec du sérum de veau foetal 10% et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine. Les cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 ont été cultivées dans du DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, 4 mM de glutamine, 10% de sérum de veau foetal, 200 μ M d'uridine, 2 mM de pyruvate et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine [9]. Les culots cellulaires (1500 g x 5 min) ont été conservés congelés (-80°C) et, pour les études biochimiques, les cellules ont été perméabilisées par deux cycles de congélation-décongélation avant les dosages enzymatiques (Bénil et al. 2006).

Pour tester l'action des SDHI sur les fibroblastes cutanés en croissance, des cellules ont étéensemencées dans des boîtes (4 x 75 cm² ; (confluence entre 20 et 25%) contenant du milieu GlucoMax (tableau 1). Après avoir laissé la culture reposer pendant une nuit, le milieu a été remplacé par les conditions souhaitées, à savoir le milieu GlucoMax ou le milieu MitoMax, complété par la quantité choisie de SDHI (conditions contrôles compensées pour le DMSO amené par la solution de SDHI; soit 14 mM au maximum). Le nombre de cellules a été estimé à partir d'images aléatoires (programme de traitement ImageJ) sans changer de milieu pendant 15 à 20 jours (une exposition à une dose unique de SDHI).

➤ **Mesures enzymatiques et effets potentiels des SDHI :**

Les activités des enzymes de la chaîne respiratoire ont été mesurées par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre à pseudo-double longueur d'onde (Cary 60, Agilent).

La succinate quinone dichlorophénolindophénol (DCPIP) réductase (SQDR) sensible au malonate, une mesure de l'activité de l'enzyme SDH isolée (CII isolée) et de la glycérol-3-phosphate quinone DCPIP réductase (GQDR), mesurant l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase isolée (G3PDH) ont été dosées comme décrit précédemment [17]. Pour étudier l'effet des SDHI sur la chaîne respiratoire, nous avons dû prendre en compte le fait que ces inhibiteurs agissent en se liant aux sites de liaison des quinones sur les complexes de la chaîne respiratoire. En conséquence, nous avons observé que l'amplitude des effets inhibiteurs de ces substances variait avec l'addition de quinones exogènes (Fig 2). Lorsque cela était possible, les effets potentiels des SDHI sur les enzymes ont donc été étudiés dans des conditions expérimentales ne nécessitant pas l'ajout de quinones exogènes. Dans

ce but, nous avons mesuré la succinate cytochrome *c* réductase sensible au malonate (SDH + CIII), la glycérol-3-phosphate cytochrome *c* réductase (G3PDH + CIII) et la decylubiquinol cytochrome *c* réductase sensible à l'antimycine (CIII) comme décrit précédemment [26]. Les effets de huit différents SDHI ont été étudiés, à savoir le flutolanil, le fluopyram, le boscalid, le fluxapyroxad, le penflufen, le penthiopyrad, l'isopyrazam et le bixafen (Fig 3), qui sont tous connus pour se lier au site de liaison des quinones de la SDH (S3 Fig). Enfin, comme le DMSO, le solvant utilisé pour les SDHI et les quinones, tend à réduire l'activité de la plupart des enzymes de la chaîne respiratoire.

Tableau 5. Milieux de culture permissifs GlucoMax et non permissifs MitoMax pour les cellules humaines déficientes en chaîne respiratoire mitochondriale.

GlucoMax ↓	Dulbecco modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)	MitoMax ↓
+	Glucose 4.5 g/l	+
+	Glutamine 4 mM	-
+	Uridine 200 µM	+
+	Pyruvate 2 mM	-
+	Pénicilline 100 U/ml	-
+	Streptomycine 100 U/ml	+
+	Sérum de veau foetal 10%	+

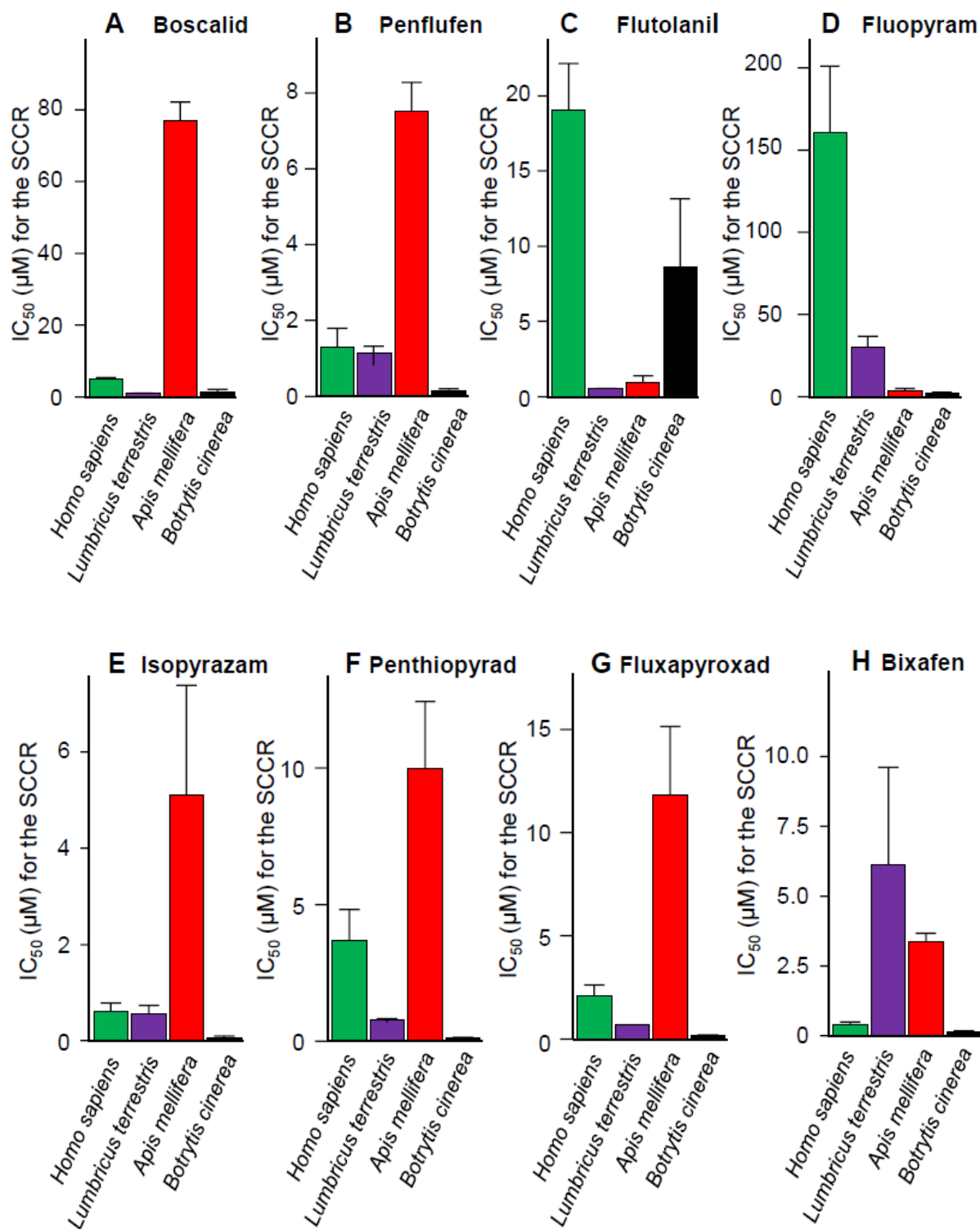


Figure 4. Valeurs des IC₅₀ des SDHI sur la succinate cytochrome c réductase (SCCR) d'*Homo sapiens*, de *Lumbricus terrestris*, d'*Apis mellifera* et de *Botrytis cinerea*. A-H, IC₅₀ (n≥3) : boscalid (A), penflufen (B), flutolanil (C), fluopyram (D), isopyrazam (E), penthiopyrad (F), fluxapyroxad (G) et bixafen (H) sur la SCCR d'*H. Sapiens* (vert), *L. terrestris* (violet), *A. mellifera* (rouge) et *B. cinerea* (noir). Notez les différences dans les échelles Y. SCCR, succinate cytochrome c réductase. (PLOS One.2019)

1.4-Résultats

➤ Effets des SDHI sur la chaîne respiratoire mitochondriale

Nous avons déterminé les effets de huit différents SDHI sur les activités de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des cellules HEK congelées-décongelées, des vers de terre, des abeilles domestiques et des champignons *B. cinerea* (Fig 4 et Tableau 2). Les valeurs d'IC50 des différents SDHI ont d'abord été estimées à partir de l'activité de la succinate cytochrome c réductase (SCCR) (Fig2). Tous les SDHI testés se sont avérés exercer un effet inhibiteur sur la SDH, quelle que soit l'origine biologique de l'enzyme, bien qu'à des degrés divers. À titre de référence, la capacité des SDHI à bloquer l'activité de la SDH a été étudiée sur l'enzyme de *B. cinerea*, l'organisme cible. Elle varie en fonction des SDHI, le flutolanil présentant une inefficacité relative (Fig 4, tableau 2). La SDH montre une sensibilité très prononcée pour les SDHI de dernière génération, avec une IC50 inférieure à 0,1 µM pour l'enzyme fongique.

La SDH humaine se révèle relativement moins sensible au fluopyram (IC50 > 150 µM) qu'au flutolanil, au boscalid, au penthiopyrad et au fluxapyroxad (valeurs des IC50 comprises entre 18,6 et 2,1 µM). L'enzyme du ver de terre semble être particulièrement sensible au boscalid, au flutolanil et au fluxapyroxad, alors que l'enzyme de l'abeille domestique est plus sensible au flutolanil et au fluopyram que les enzymes d'autres organismes non ciblés. Les SDHI de dernière génération (Fig 3) sont particulièrement efficaces pour bloquer l'enzyme humaine. Les valeurs d'IC50 calculées pour le penflufen, l'isopyrazam et le bixafen sont toutes de l'ordre de 1 µM ou moins. Une variabilité similaire entre les effets des différents SDHI a été observée pour la SDH des vers de terre et des abeilles domestiques, qui présentaient respectivement une sensibilité similaire et plus élevée aux SDHI de dernière génération. Pour la plupart des SDHI, les valeurs des IC50 étaient plus basses pour l'enzyme de *B. cinerea*, à l'exception notable du flutolanil, qui se révèle particulièrement actif contre les enzymes du ver de terre et de l'abeille domestique. Fait troublant, l'étude de la sensibilité aux SDHI des enzymes

SDH de seulement 4 espèces a suffi à révéler qu'au minimum une de ces espèces était très sensible à au moins l'une de ces SDHI (Fig 4)

Nous avons ensuite étudié l'effet des SDHI sur d'autres activités de la chaîne respiratoire dépendantes du coenzyme Q, telles que les activités du glycérol-3-phosphate cytochrome c réductase (GCCR) et de l'ubiquinol cytochrome c réductase (QCCR), cette dernière reflétant l'activité complexe III (CIII). Il est intéressant de noter que l'isopyrazam et, de manière encore plus efficace, le bixafen inhibent également l'activité de la GCCR humain (IC50 21,1 μM) (Tableau 2).

Tableau 6 . Effets inhibiteurs (valeurs IC50) de huit SDHI sur les activités de la chaîne respiratoire de quatre espèces différentes. SCCR, succinate cytochrome c réductase; GCCR, glycérol-3-phosphate cytochrome c réductase ; QCCR, quinol cytochrome c réductase.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Lumbricus terrestris.</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Flutolanil	SCCR: 18.7 \pm 3.5 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR: 0.36 \pm 0.02 μM GCCR: 450 \pm 70 μM QCCR > 500 μM	SCCR: 0.8 \pm 0.5 μM GCCR > 500 μM GCCR > 500 μM	SCCR: 8.6 \pm 4.5 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM
Fluopyram	SCCR 160 \pm 40 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 30.6 \pm 7.6 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 3.8 \pm 0.3 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 0.2 \pm 0.1 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM
Boscalid	SCCR 4.8 \pm 0.2 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 0.5 \pm 0.3 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 76.7 \pm 6.0 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 0.8 \pm 1.1 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM
Fluxapyroxad	SCCR 2.1 \pm 0.7 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 0.71 \pm 0.07 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 11.7 \pm 3.4 μM GCCR 205 \pm 34 μM QCCR 300 \pm 5 μM	SCCR 0.095 \pm 0.008 μM GCCR 60 \pm 56 μM QCCR 67 \pm 53 μM
Penflufen	SCCR 1.3 \pm 0.3 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 1.13 \pm 0.16 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 7.5 \pm 0.7 μM GCCR > 500 μM QCCR > 500 μM	SCCR 0.13 \pm 0.06 μM GCCR 80 \pm 57 μM QCCR 433 \pm 58 μM
Penthiopyrad	SCCR 3.7 \pm 1.1 μM GCCR 211 \pm 15 μM QCCR 349 \pm 72 μM	SCCR 0.70 \pm 0.01 μM GCCR 254 \pm 65 μM QCCR 297 \pm 4 μM	SCCR 10 \pm 2 μM GCCR 251 \pm 75 μM QCCR 268 \pm 44 μM	SCCR 0.045 \pm 0.023 μM GCCR 93.5 \pm 47 μM QCCR 105 \pm 7.1 μM
Isopyrazam	SCCR 0.63 \pm 0.18 μM GCCR 51.3 \pm 5.8 μM QCCR 125 \pm 35 μM	SCCR 0.46 \pm 0.17 μM GCCR 83 \pm 5 μM QCCR 76 \pm 21 μM	SCCR 5.1 \pm 2.3 μM GCCR 97 \pm 9 μM QCCR 87 \pm 18 μM	SCCR 0.023 \pm 0.004 μM GCCR 27.9 \pm 10.6 μM QCCR 14.2 \pm 5.6 μM
Bixafen	SCCR 0.34 \pm 0.12 μM GCCR 21.1 \pm 9.3 μM QCCR 15.5 \pm 13.4 μM	SCCR 6.0 \pm 3.6 μM GCCR 450 \pm 71 μM QCCR \geq 500 μM	SCCR 3.3 \pm 0.33 μM GCCR 24.1 \pm 11.4 μM QCCR 5.7 \pm 5.3 μM	SCCR 0.07 \pm 0.06 μM GCCR 22.5 \pm 3.5 μM QCCR 22.2 \pm 14.4 μM

1.6-Discussion :

Les données réunies établissent les effets inhibiteurs de huit SDHI sur la SDH de quatre espèces biologiques, à savoir le champignon *B. cinerea*, le ver de terre *L. terrestris*, l'abeille domestique *A. mellifera* et les humains (*H. sapiens*), avec des inhibitions variables. Cette observation reflète l'extrême conservation des sous-unités SDH B, C, D constituant le site de réduction et de fixation de l'ubiquinone sur la SDH (Fig 2 suppl). L'absence de spécificité d'espèce de la carboxine, le premier SDHI, a été reconnue dès 1976 [16], lorsque les auteurs ont noté la très grande affinité de la carboxine pour la SDH des mammifères [38]. La carboxine a été un temps largement pulvérisée comme fongicide sur le blé canadien, à des doses similaires à celles utilisées pour les SDHI qui en dérivent, représentant un risque environnemental majeur en raison de ce non spécificité [38]. Dans ce travail, nous avons étendu cette observation à une série de SDHI dérivés de la carboxine, avec laquelle ils partagent un mode d'action commun pour l'inhibition de la SDH. Les fabricants de produits agrochimiques connaissent en réalité cette absence de spécificité d'espèce. Ainsi une partie des SDHI est vendue comme efficace pour tuer les nématodes. De même, le danger représenté par les SDHI pour les organismes aquatiques est reconnu depuis longtemps, comme l'indiquent les fiches techniques, et se trouve amplement confirmé par les données récentes obtenues pour le poisson *Danio rerio* avec le boscalid ou le penthiopyrad et pour les embryons du batracien *Xenopus tropicalis* avec l'isopyrazam ou le bixafen.

Simultanément, il a été démontré que les effets toxiques du boscalid sur les abeilles sont observables pour peu que la durée d'exposition soit suffisante.

L'effet inhibiteur des SDHI s'étend vraisemblablement à la plupart des organismes vivants, modulé par la propension de chaque organisme à absorber, métaboliser et/ou excréter chacun des SDHI. Ainsi, les plantes dont les feuilles présentent une mauvaise absorption des SDHI seront épargnées tant que le pesticide n'entrera pas en contact avec les racines, lesquelles sont susceptibles d'absorber les SDHI. Enfin, les interactions toxicologiques résultant de l'utilisation fréquente d'un mélange de pesticides ont été largement ignorées.

En particulier les SDHI sont fréquemment associés à des inhibiteurs du CIII (par exemple, la strobilurine), dans les préparations commerciales de SDHI (encadré 4) [42]. Les effets toxiques

d'agents de perméabilisation supplémentaires sur la faune que l'on trouve dans plusieurs mélanges SDHI sont également largement ignorés. Bien sûr, il est extrêmement dangereux de comparer les valeurs de IC50 obtenues *in vitro* dans des conditions de laboratoire avec les concentrations de SDHI pouvant résulter de l'application de ces pesticides sur des cultures.

On peut cependant déterminer de manière fiable la concentration de SDHI à la sortie des buses de diffusion. Dans le cas du bixafen, elle est d'environ 0,6 à 1,8 mM selon les recommandations distribuées aux agriculteurs, ce qui correspond à un nuage de nébulisation de 75-125 g/ ha de bixafen. L'exposition finale dépend de nombreux facteurs difficiles à maîtriser, notamment les conditions d'épandage, la nature du sol, son couvert végétal, etc. Du point de vue réglementaire, la DJA, par exemple pour le boscalid et le bixafen, est de 0,04 et 0,02 mg / kg / jour, respectivement (voir légende Fig 3). Pour un adulte moyen (60 kg / volume sanguin 5 l), cela correspond à une concentration sanguine d'environ 1,40 et 0,58 μ M.

À ce jour, il a été rapporté que les SDHI inhibaient puissamment l'activité de la SDH, mais leurs effets sur d'autres sites de la chaîne respiratoire, n'ont pas été décrits. Nous montrons ici que plusieurs des SDHI de dernière génération inhibent le CIII en plus de la SDH, augmentant ainsi à la fois leur activité fongicide et leur toxicité vis-à-vis d'autres organismes. À ce jour, cet effet supplémentaire n'a pas été pris en compte dans la commercialisation d'aucune de ces molécules. Il est intéressant de noter que l'existence d'un site additionnel autre que la SDH a été récemment décrit, suggérant l'existence d'au moins un deuxième site d'action des SDHI.

Les effets de l'inhibition de la chaîne respiratoire sur la croissance des cellules humaines en culture dépendent grandement de l'équilibre entre la glycolyse et l'activité mitochondriale. Ainsi, les cellules dites rho°, dépourvues d'ADN mitochondrial et donc d'activités de la chaîne respiratoire, sont auxotrophes pour l'uridine mais peuvent générer de l'ATP à partir du glucose disponible par le biais de la glycolyse [45], produisant une grande quantité de lactate (Fig 1 et Fig 1 suppl). L'auxotrophie pour l'uridine a pour origine la rupture complète de la partie terminale de la chaîne respiratoire (CIII, CIV) qui entraîne le blocage de la dihydroorotate déshydrogénase. Cette dernière enzyme produit normalement l'orotate nécessaire à la synthèse des pyrimidines, indispensable à la prolifération cellulaire (Fig 1 suppl), rendant nécessaire une supplémentation en uridine pour la croissance de

cellules présentant soit un déficit spécifique de l'activité du CIII ou du CIV [46] soit un déficit généralisé lié à l'absence d'ADN mitochondrial et donc sans chaîne respiratoire fonctionnelle . Ceci est illustré ici par comparaison des croissances cellulaires en milieu permissif GlucoMax et en milieu non permissif MitoMax, ce dernier seul permettant la détection de cellules hébergeant des mitochondries avec des chaînes respiratoires déficientes. L'utilisation de ce milieu MitoMax non permissif n'est pas destinée à représenter une situation physiologique mais à permettre de détecter un éventuel effet délétère d'une substance donnée sur les mitochondries. Ce milieu MitoMax devrait désormais être utilisé pour tester en culture cellulaire toute substance ciblant les mitochondries ceci dans le contexte de l'évaluation des risques liés aux organismes non ciblés.

Dans cette étude, nous avons montré une application efficace de cette stratégie pour les cellules traitées par SDHI. En effet, l'utilisation d'un milieu standard contenant du glucose rend impossible la détection d'un blocage même grave de la SDH dans les cellules humaines. Ces expériences suggèrent la nécessité de réévaluer la toxicité des SDHI dans des cellules humaines en culture en utilisant un milieu type MitoMax stimulant les mitochondries et contenant de la glutamine comme seule source de carbone. Quoi qu'il en soit, étant donné la complexité des phénomènes pouvant résulter d'un stress mitochondrial (surproduction de superoxyde, accumulation de lactate, manque d'ATP, déséquilibre métabolique, etc.), il est essentiel de respecter une durée suffisante (> 15 jours) pour ces évaluations, ceci en fonction de la concentration de l'inhibiteur utilisé. Un autre aspect montré par cette étude est l'augmentation de la sensibilité aux SDHI des cellules humaines abritant des mitochondries défectueuses. Cette constatation est valable quelle que soit la nature du défaut mitochondrial, soit qu'il résulte directement d'un déficit partiel de la chaîne respiratoire et/ou d'une hypersensibilité au stress oxydatif due à une mauvaise induction de la SOD (*encadré 4*). Les anomalies de la SDH, partielles et isolées, sont des pathologies humaines rares généralement associées à des phénotypes neurologiques ou cardiaques. Cependant, s'ajoutent aux défauts profonds de la SDH mis-en. paragangliomes ou certaines tumeurs gastro-intestinales de patients porteurs de mutations dans les gènes SDH suppresseurs de tumeur les déficits partiels en SDH observé dans des maladies humaines affectant différents organes, telles que FRDA, syndrome de Barth, leucoencéphalopathies diverses infertilité masculine liée à une asthénozoospermie, myopathie , de rare évidence dans les phéochromocytomes et

les syndromes d'hémolyse urémique et de rhabdomyolyse . Cette hypersensibilité définit une sous-population qui pourrait être particulièrement à risque lorsqu'elle est en contact avec des SDHI. Nos résultats suggèrent que, dans cette sous-population et également dans des populations atteintes de FRDA ou de la maladie d'Alzheimer, connues pour présenter une susceptibilité accrue au stress oxydatif, une caractéristique très courante des maladies humaines, les SDHI pourraient contribuer à une progression accélérée de la maladie.

Tout d'abord, ces travaux établissent que, à l'instar de la molécule précédente, la carboxine, tous les SDHI testés inhibent la SDH et cela chez toutes les espèces étudiées, mais avec une efficacité variable. De plus, les SDHI de nouvelle génération contenant un fragment méthyl-pyrazol (Fig 3) inhibent également le complexe III de la chaîne respiratoire. Ce manque de spécificité constitue un problème majeur compte tenu de l'utilisation généralisée actuelle de ces SDHI. Bien que ce manque de sélectivité (CII + CIII) puisse être la source de l'efficacité des SDHI de dernière génération, il pourrait également constituer un risque supplémentaire pour les organismes exposés. Notre étude a ensuite établi que les conditions standards utilisées pour tester la toxicité éventuelle des SDHI (ainsi que de tout autre pesticide ciblant les mitochondries, les mitochondriotoxiques) peuvent masquer un effet toxique potentiel. Par conséquent, nous recommandons de modifier d'urgence les tests réglementaires pour la détermination de la toxicité des molécules et l'utilisation du milieu de croissance MitoMax dans lequel la glutamine est la seule source de carbone.

Enfin, nous montrons qu'un défaut mitochondrial préexistant, tel qu'un dysfonctionnement partiel de la SDH ou une hypersensibilité aux attaques oxydatives (FRDA, FAD), augmente la sensibilité aux SDHI, suggérant un risque particulier pour les individus présentant un tel dysfonctionnement.

1.7-Conclusion :

Tout d'abord, ces travaux établissent que, à l'instar de la molécule précédente, la carboxine, tous les SDHI testés inhibent la SDH et cela chez toutes les espèces étudiées, mais avec une efficacité variable. De plus, les SDHI de nouvelle génération contenant un fragment méthyl-pyrazol (Fig 3) inhibent également le complexe III de la chaîne respiratoire. Ce manque de spécificité constitue un problème majeur compte tenu de l'utilisation généralisée actuelle de ces SDHI. Bien que ce manque de sélectivité (CII + CIII) puisse être la source de l'efficacité des SDHI de dernière génération, il pourrait également constituer un risque supplémentaire pour les organismes exposés.

Notre étude a ensuite établi que les conditions standards utilisées pour tester la toxicité éventuelle des SDHI (ainsi que de tout autre pesticide ciblant les mitochondries, les mitochondriotoxiques) peuvent masquer un effet toxique potentiel. Par conséquent, nous recommandons de modifier d'urgence les tests réglementaires pour la détermination de la toxicité des molécules et l'utilisation du milieu de croissance MitoMax dans lequel la glutamine est la seule source de carbone.

Enfin, nous montrons qu'un défaut mitochondrial préexistant, tel qu'un dysfonctionnement partiel de la SDH ou une hypersensibilité aux attaques oxydatives (FRDA, FAD), augmente la sensibilité aux SDHI, suggérant un risque particulier pour les individus présentant un tel dysfonctionnement.

2- Intitulé : Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs (revue francophone des laboratoires • n° 501 • avril 2018) (Annexe 2)

2.1-Résumé :

Chez l'homme, les dysfonctions des enzymes du cycle de Krebs liées à des mutations causent des encéphalopathies sévères du jeune enfant, ou différents types de tumeurs et de cancers touchant différents organes. Ainsi des mutations des gènes de la succinate-déshydrogénase ont été identifiées dans des formes familiales de phéochromocytomes et paragangliomes.

Les mutations du gène de la fumarase s'observent dans des léiomyomes utérins en association avec des cancers rénaux, mais des cas d'encéphalopathies de l'enfant ont aussi été observés. Les mutations des gènes de l'isocitrate-déshydrogénase peuvent représenter jusqu'à 20 % des leucémies myéloïdes aiguës et jusqu'à 80 % dans certains gliomes. On ne sait actuellement expliciter la diversité des conséquences possibles de ces mutations : encéphalopathies *versus* cancers, nature des tissus affectés, cinétique variable d'apparition des symptômes. Il semble en revanche établi que les anomalies dans les équilibres métaboliques qui résultent de ces mutations soient à la base des processus tumoraux en modulant l'activité d'hydroxylases susceptibles d'affecter certains facteurs de transcriptions, mais aussi la méthylation de l'ADN et les histones.

Dans ce contexte, il semble étonnant que soient largement utilisés certains fongicides dont l'effet est de bloquer une étape centrale du cycle de Krebs, la **succinate-déshydrogénase**.

Le principe de précaution voudrait sans aucun doute de réévaluer urgemment la nécessité de l'usage de telles substances pour l'homme et l'environnement.

2.2- introduction :

Véritable plaque tournante du métabolisme des acides organiques dans toutes les cellules, le cycle de Krebs localisé dans les mitochondries a depuis longtemps été montré comme fondamental pour la vie cellulaire.

- il fournit à la chaîne respiratoire une partie des équivalents réduits nécessaire à la synthèse d'ATP ;
- une autre partie des équivalents réduits sont exportés hors des mitochondries dans certaines conditions de stress et vont accélérer la synthèse de NADPH et de glutathion ; en assurant une intense activité métabolique, il participe à la production mitochondriale de chaleur ;
- il est crucial dans la production d'intermédiaires métaboliques essentiels pour diverses réactions anaboliques extra-mitochondriales ;
- à partir du pyruvate essentiellement produit par la glycolyse, il produit les métabolites nécessaires à la biosynthèse des purines et de divers acides aminés. Il n'est donc pas vraiment étonnant que toute dysfonction majeure du cycle ait longtemps été jugée incompatible avec la vie.

Depuis les années 90, la description d'un nombre, certes limité (moins de 300 cas rapportés), de cas de mutations délétères dans des atteintes neurologiques affectant des gènes codant des enzymes du cycle de Krebs, a démontré que la vie cellulaire reste compatible avec des dysfonctions notables de ce cycle, avec les premières mutations rapportées dans le gène de la fumarase, puis de la **succinate-déshydrogénase (SDH)** dans deux cas d'encéphalopathies sévères de l'enfant.

2.3-Description des différents phénotypes associés aux mutations dans les gènes du cycle :

Avec la description des différents phénotypes associés aux mutations dans les gènes du cycle, il est rapidement apparu que les fonctions et caractéristiques du cycle de

Krebs, ainsi que le rôle des intermédiaires métaboliques qu'il inter-convertis, étaient loin d'être réductibles au schéma traditionnellement admis. Du regroupement de huit protéines impliquées dans le cycle tel qu'initialement décrit par Hans Adolf Krebs et travaillant de concert pour métaboliser l'acétyl-CoA, il convient de noter que les études de flux métaboliques ont montré que le cycle devrait en être en fait considéré comme deux entités distinctes. Chacune de ses deux entités, connectées par l'intermédiaire d'une transaminase (*figure 1, annex 2*), est caractérisée par un flux cinétique propre, une situation incompatible avec un fonctionnement à travers une unique entité. Si

l'on y ajoute la redondance d'une partie des protéines du cycle dans les compartiments mitochondriaux et cytosoliques, sa sollicitation changeante en fonction des besoins métaboliques et des situations pathologiques, éventuellement variables dans le temps et dans l'espace d'un organisme vivant, il devient évident que l'unicité du cycle telle qu'elle a été décrite avec une organisation rigide, doit sans doute être reconsidérée. Finalement, le continuum métabolique autour des acides organiques du cycle implique d'intégrer à toute réflexion sur les pathologies associées, des gènes dont les produits constituent des partenaires à part entière du cycle (comme la pyruvate-déshydrogénase, par exemple). Conformément à cette dernière observation, l'étude des pathologies associées aux mutations des gènes des voies métaboliques directement afférentes et efférentes (*figure 1, annexe 2*) montre la similitude avec celles associées aux mutations des gènes codant les protéines du cycle de Krebs proprement dit.

2.4-Deux univers de maladies humaines

Des mutations dans plus d'une quinzaine de gènes de ces chaînons métaboliques sont ainsi connues comme étant à l'origine de pathologies humaines, incluant les gènes codant les protéines du cycle sensu stricto (*tableau I, annexe 2*). Ces mutations correspondent à différentes entités pathologiques qui peuvent intervenir à tous les âges de la vie et toucher différents organes. Pour une part des présentations cliniques, en particulier celles historiquement décrites les premières dans les années 90, on observe de

façon fréquente des atteintes neurologiques de l'enfant (*tableau I, colonne 4*) . Celles-ci sont très similaires à celles observées pour les atteintes des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale qui sont supposées avoir pour conséquence un déficit énergétique lié à une synthèse défectueuse d'ATP, et/ou des anomalies dans l'utilisation de l'oxygène résultant en la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (superoxydes) . Le manque d'ATP et l'excès de superoxydes sont connus pour favoriser nécrose et apoptose et à ce titre ils constituent une trame pour expliciter une partie des atteintes, nécrose tissulaire et dysfonctions sévères observées dans ces atteintes essentiellement neurologiques Mais depuis les années 2000, une succession d'études a montré que des atteintes précisément dans ces mêmes gènes étaient à l'origine d'un tout autre type de maladies humaines résultant cette fois du développement de tumeurs et cancers . Selon les gènes mutés, certains organes semblent plus particulièrement atteints (*tableau I, colonne 3 annexe 3*)

Ainsi, les mutations des gènes codant pour la **SDH** conduisent le plus souvent à des paragangliomes (des tumeurs bénignes affectant essentiellement soit le système nerveux parasympathique : tumeurs des glomus au niveau de la tête et du cou ; soit le système nerveux sympathique extra-surrénalien) ou des phéochromocytomes (tumeurs dans la médullosurrénale), alors que les mutations touchant la fumarase conduisent le plus fréquemment à des fibromes utérins (*tableau I*). Il existe cependant un certain degré de chevauchement. Ainsi des cancers rénaux, ou des paragangliomes, peuvent être observés en liaison avec des atteintes génétiques impliquant les gènes codant la fumarase ou **la SDH** (*tableau I, annexe 3*).

2.5-Conclusion :

Le rôle de plaque tournante pour la vie cellulaire attribuée au cycle de Krebs reste plus que jamais d'actualité. En outre, il semble désormais raisonnable de penser que toute altération anormale et continue des balances entre métabolites du cycle de Krebs, favorisée bien sûr à l'extrême par des mutations génétiques, mais aussi par des conditions externes défavorables, en particulier par l'exposition à certains polluants environnementaux, puisse avoir sur le long terme des conséquences (neuropathies, cancers) que nous ne faisons que juste entrevoir.

Dans ce contexte, on peut s'étonner que parmi les fongicides de dernière génération actuellement recommandés dans le monde pour améliorer les rendements de la culture des graminées (blés et autres

céréales), la conservation des fruits, ou... faciliter l'entretien des pelouses de golf (*figure 3*), figurent des agents (SDHIs, inhibiteurs de la SDH) qui visent directement une enzyme du cycle de Krebs. Initialement, les premiers SDHIs ont été introduits dans les années 60, mais à l'époque ils n'ont pas eu une diffusion extensive du fait de leur efficacité limitée. Une seconde génération de **fongicides SDHI** destinés à la protection des récoltes a été mise sur le marché après les années 2000 visant à traiter un grand spectre de maladies des plantes, le Boscalid étant le premier et réputé le plus efficace de ces antifongiques. Les **SDHIs** sont désormais utilisés à grande échelle (70 % des surfaces traitées de blé tendre et 80 % en orge d'hiver en 2014; 90 % des surfaces prévues en 2021).

3- Intitulé : avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) ». (anses.2019, Annexe : 3)

3.1-Résumé :

L'usage extensif des SDHI depuis les années 2000. Ces substances ont la propriété de bloquer la respiration des champignons, mais au regard de leur mode d'action non-spécifique (blocage de l'activité d'une enzyme essentielle présente chez tous les organismes vivants possédant des mitochondries), ils sont susceptibles d'avoir une action délétère sur la plupart des organismes vivants exposés, selon les doses et le temps d'exposition.

Nous soulignons aussi à l'époque les risques potentiels de leur utilisation pour la santé humaine, en pointant l'absence de données sur ce point, compte tenu de mécanismes de toxicité non pris en compte par les tests réglementaires (mitotoxicité, reprogrammation métabolique, dérégulation de l'épigénome), point sur lequel nous avons insisté lors de notre audition à l'Anses le 14 Juin 2018. A l'issue de ce message d'alerte communiqué dans un premier temps à l'Anses fin Octobre 2017, puis rendu public en Avril 2018, l'Anses s'est autosaisie (annexe 4) , le 24 mai 2018 pour la réalisation d'une expertise collective.

3.2- introduction :

Cette actualisation prendra en compte les publications scientifiques récentes dont l'article publié le 7 novembre 2019 dans la revue scientifique *PLOS One* évoquant la toxicité de fongicides SDHI sur des cellules cultivées in vitro » signale l'Agence dans un récent communiqué alors qu'elle devrait bientôt publier de nouvelles conclusions sur le sujet.

A la suite des travaux d'un groupe de personnes désignées comme expertes, l'Anses a délivré le 15/01/2019 un message plutôt rassurant sur l'utilisation faite des SDHI (pesticides conçus pour bloquer la succinate déshydrogénase – SDH, une enzyme des mitochondries présente dans toutes les espèces vivantes).

Cet avis conclue à l'absence « d'éléments en faveur de l'existence d'une alerte sanitaire » bien que soulignant que les questions actuellement sans réponse requièrent des études complémentaires.

Cette étude scientifique, qui porte sur les **SDHI**, les **Inhibiteurs de la Succinate DésHydrogénase** (la **SDH** ou complexe II, une enzyme des mitochondries, impliquée dans la respiration des cellules),

Confirme, en l'étendant à 8 des SDHI utilisés en France, le caractère général de l'effet des SDHI : quelques soient les espèces où ont été testée les SDHI, la SDH a été inhibée ;

- Dévoile une cible nouvelle des SDHI de dernière génération, le complexe III ;
- Montre la toxicité des SDHI sur des cellules humaines en culture, toxicité masquée par les conditions utilisées dans les tests réglementaires;
- Montre la capacité des SDHI à induire un stress oxydatif dans les cellules humaines ;
- Souligne l'hypersensibilité des cellules de malades dont les mitochondries fonctionnent déjà mal soit du fait d'une maladie causée par un déficit partiel de la SDH, soit d'une maladie neurologique (ataxie de Friedreich) ou encore neurodégénératives (maladie d'Alzheimer)

3.3- Hypothèses identifiées auprès des chercheurs lanceurs d'alerte, relatives aux substances actives SDHI.

➤ Physiopathologie de la SDH humaine

La SDH, également appelée succinate ubiquinone oxydoréductase (EC 1.3.5.1), ou complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, est une enzyme constituée de 4 sous unités (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), codées par des séquences d'acide désoxyribonucléique uniquement nucléaires. SDHA, une flavoprotéine, et SDHB, une protéine Fe-S, sont deux sous unités situées au niveau de la matrice mitochondriale alors que SDHC et SDHD sont enchâssées dans la membrane interne. L'ensemble comporte deux sites actifs, un pour l'oxydation du succinate en fumarate et un pour la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol ces fonctions de couplage entre la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs sont essentielles au bon fonctionnement de la respiration mitochondriale et par suite jouent un rôle central dans toutes les fonctions cellulaires énergivores. Les sous-unités A et B de cette hétéroprotéine sont plus conservées entre les espèces que ne le sont les sous-unités C et D.

Malgré ce rôle central des enzymes de la chaîne respiratoire, il a été démontré depuis les années 90 que la vie cellulaire restait compatible malgré des dysfonctionnements du cycle de Krebs induits par des mutations dans les gènes codant pour ces enzymes. Pour celles intéressant plus spécifiquement cette expertise, plusieurs mutations héréditaires, et plus rarement sporadiques, des différentes sous-unités de la SDH humaine ont été identifiées depuis 1995 et associées à des pathologies diverses ayant fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques.

Il s'agit essentiellement de pathologies cancéreuses (adénome hypophysaire et paragangliome/phéochromocytome, carcinome rénal, tumeurs gastrointestinales), neurologiques (encéphalopathies, leukodystrophie, syndrome de Leigh) et cardiaques (cardiomyopathies), pouvant survenir dans l'enfance. De même, des modifications épigénétiques de séquences clés de ces gènes peuvent altérer l'expression protéique de sous unités de la SDH et être associées à certains cancers.

Les pathologies liées à des mutations sont actuellement considérées comme rares et souvent détectées sous forme de cas groupés familiaux⁵⁴. Les tumeurs sont le plus souvent bénignes mais il existe un potentiel de malignité, les tumeurs associées à des mutations du gène SDHB ayant davantage tendance à la malignité. La transmission des Phéochromocytomes-paragangliomes héréditaires est autosomique dominante (à pénétrance incomplète), mais les gènes SDHD et SDHAF2 sont soumis à l’empreinte génomique maternelle et s’expriment si la mutation est d’origine paternelle.

La pénétrance dépend du gène, de l’âge et de la localisation tumorale. Les mécanismes de la cancérisation secondaire à un déficit important en SDH cellulaire sont partiellement élucidés et liés, au moins en partie, à l’accumulation de succinate dont le rôle dans l’oncogénèse et la progression tumorale a été récemment mis en évidence⁵⁵. Pour ne citer qu’un élément supportant le rôle de l’accumulation de succinate dans l’oncogénèse, la surexpression observée des facteurs de transcription induits par l’hypoxie (HIF) et de certains de leurs gènes cibles permettrait l’adaptation cellulaire et tissulaire à l’hypoxie et par suite conférerait une capacité sélective de prolifération à des clones tumoraux. Il apparaît que dans les cellules déficitaires en SDH, le succinate accumulé se comporte comme un oncométabolite dont le rôle dans les régulations épigénétiques cellulaires, favoriserait la promotion du phénotype tumoral.

3.4- Hypothèse d’effets sanitaires chez l’Homme comparables à ceux identifiés chez les malades porteurs de mutations de la SDH.

➤ expositions alimentaires, non alimentaires et professionnelles.

Concernant la contamination des denrées, les éléments exposés précédemment démontrent, pour les SDHI recherchés, que cette contamination est très en-deçà des limites réglementaires connues et ne représente qu’une faible fraction des doses actuellement réputées sans effet, même après prise en compte du régime alimentaire total. Ce résultat est cohérent avec l’évaluation des substances actives au cours de laquelle les différentes situations d’exposition (consommateur, utilisateur professionnel etc.) sont scénarisées et comparées avec les valeurs toxicologiques de références adaptées : en cas de

dépassement de ces valeurs, la mise sur le marché des substances n'est pas autorisée. Enfin, ce résultat suggère que les bonnes pratiques agricoles sont respectées pour cette famille de substances.

Les effets cancérigènes décrits chez les patients déficitaires en SDH interviennent dans des situations d'altération durable du complexe II et nécessiteraient, pour conduire à ces effets chez des patients non mutés un phénomène d'inhibition irréversible même partielle, de la SDH par des molécules exogènes. Ce mode d'inhibition ne semble pas être celui des SDHI utilisés comme substances actives phytopharmaceutiques, qui empêchent l'arrivée du substrat au site actif par encombrement stérique. Les SDHI ciblent tous le site de liaison de l'ubiquinone situé à l'interface entre les sous unités SDHB, -C et -D59. Bien que cette structure protéique hétérotétramérique soit bien conservée, les séquences protéiques peuvent diverger entre les espèces et conduire à des niveaux d'inhibition variables, en particulier entre les règnes fongique, végétal et animal⁶⁰. Ces différences peuvent expliquer des différences d'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme. Ainsi, dans des espèces phytopathogéniques telles que *Botrytis cinerea*, la SDH est fortement inhibée à faible concentration par le boscalid. Chez la levure *Saccharomyces cerevisia*, cette inhibition est encore observée mais pour des concentrations plus élevées. Chez une espèce de mammifère, l'enzyme provenant de foie de porc est quant à elle, pratiquement résistante⁶¹. Ces différences de sensibilité inter-espèces pourraient être expliquées par les différences structurales dans les sous unités et conditionner la réponse de l'organisme aux effets sanitaires potentiels.

D'une manière synthétique, la transposition des observations cliniques réalisées chez les patients porteurs de mutation de la SDH vers des personnes exposées via l'environnement à des SDHI, se heurte actuellement aux incertitudes suivantes pour lesquelles il n'existe pas ou peu de données :

- la sensibilité de l'enzyme humaine aux différentes substances actives SDHI,
- les niveaux réels d'exposition au niveau des cibles cellulaires (dose interne) dans le contexte de molécules fortement métabolisées,
- le possible effet de cette inhibition isolée, et a priori limitée, dans un contexte de forte régulation sous l'influence de facteurs internes et externes.

3.5. Conclusion

Considère donc que les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la vigilance :

- n'apportent pas d'éléments en faveur d'une exposition qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées,
- mettent en évidence des incertitudes résiduelles sur des risques qui auraient pu ne pas être pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées. Ces incertitudes, en l'absence de signal d'alerte sanitaire,

4.3-Conclusions générale

Les pesticides SDHI sont supposés tuer les champignons responsables de la pourriture des produits végétaux. Mais on sait aujourd'hui qu'ils s'attaquent également aux populations de vers de terre, de nématodes, d'insectes, à la faune aquatique, etc., créant des ruptures inévitables dans les chaînes alimentaires. On sait aussi qu'ils représentent un risque pour l'homme. Il est établi que les SDHI inhibent la respiration cellulaire en bloquant une enzyme des mitochondries, la succinate déshydrogénase (SDH), cela sans spécificité d'espèce (1). Ils bloquent autant l'enzyme des vers de terre, des abeilles, des champignons que celle de l'homme. Rien d'étonnant à cela, cette enzyme a été extraordinairement conservée au cours de l'évolution, et est quasiment identique chez toutes les espèces.

Ces pesticides participent, au côté du changement climatique et des pratiques agricoles à court terme, à la perte de la biodiversité. Les chiffres de l'écocide des insectes, des oiseaux, des petits mammifères sont effrayants : l'urgence est absolue.

Pour l'homme, nous voilà désormais assis sur une bombe incontrôlable. Les SDHI sont partout, dans l'air, la terre, et l'eau. La SDH et ses produits ont un rôle clef dans la vie de la cellule et des organismes vivants. La complexité de ce rôle est telle qu'à ce jour, personne ne peut dire quand et comment cette bombe explosera : malformations, maladies neurologiques, cancers ? Les scientifiques, dont nous sommes, doivent se l'avouer, ils savent juste que le risque est considérable et cela encore plus pour les personnes dont les mitochondries ne fonctionnent déjà pas très bien (malades de Parkinson, d'Alzheimer, atteints d'ataxie, ou d'une maladie mitochondriale). Nous étions deux en 2017, 11 en 2018, 450 début 2020 dans un appel paru dans *le Monde*, à demander en vain l'application urgente du principe de précaution et la remise en cause de l'usage immodéré, répété et préventif des SDHI.

Si la catastrophe écologique est là, que le risque pour l'homme est indiscutable, le bénéfice des SDHI pour l'agriculture est loin d'être évident. Malgré nos demandes, nous n'avons pas obtenu de données établissant sérieusement un quelconque bénéfice significatif. Les seules publications scientifiques sur ce sujet soulignent la difficulté de quantifier l'impact des fongicides sur les rendements. Elles montrent de grandes variations dans les mesures, cela pour des gains souvent inférieurs à ces variations. La réalité est que l'on a fait investir dans l'achat de machines très coûteuses destinées à répandre ces pesticides, que l'on a détruit une agriculture pérenne, sur la base d'une tromperie qui apparaît progressivement.

Pourtant, malgré l'urgence, rapports, expertises, auditions, financement de projets illusoires se succèdent sans aboutir depuis trois ans. L'actualité du moment sur les SDHI ? La mise en place par l'Anses d'un x ième groupe de travail d'une quinzaine de personnes qui permettra d'étudier de nouveau à loisir les moins de 25 publications scientifiques disponibles sur le sujet (selon les dires mêmes de l'Anses) en attendant d'analyser le rapport de l'Inserm, demandé en avril 2018, et prévu, au mieux, pour novembre 2020 !

L'absence d'effets nocifs relevés chez les personnes travaillant en agriculture (dans le cadre des dispositifs de surveillance actuels) est une bonne nouvelle. Cela pourrait signifier que nous nous trouvons temporellement en amont de la possibilité de déceler un effet de l'exposition aux SDHI sur la santé humaine.

Il nous semble indispensable que les risques liés à l'utilisation des SDHI soient réévalués et que cette évaluation prenne désormais en considération leur mode d'action lié à un blocage du complexe II de la chaîne respiratoire des mitochondries. Ainsi, le fait que certaines substances actives possédant des modes d'action voisins (par exemple la roténone, qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire) aient dû être retirées du marché.

Nous apprécions que nous ayons soulevées, validité attestée par l'intention affirmée de poursuivre ou d'engager des recherches sur la dangerosité des SDHI. Nous regrettons cependant que la connaissance du mode d'action des SDHI, et de leur capacité à inhiber également l'enzyme humaine ainsi que celle d'autres organismes vivants (abeilles, lumbrics) et enfin, la connaissance des pathologies liées au blocage de la SDH chez l'être humain, ne conduisent pas à appliquer le principe de précaution en suspendant l'utilisation des SDHI ou en restreignant l'utilisation, tant que l'absence d'impact de ces pesticides sur l'environnement et sur l'être humain n'a pas été établi.

Liste des références bibliographiques

ACTA, 2005. Index Phytosanitaire ACTA 2005.41ème. *Association de Coordination*

AISSAOUI A ., 2012 .Évaluation du niveau de contamination des eaux de barrage hammam Grouz de la région de Oued Ath mania (wilaya de MILA) par les activités agricoles .magister en biologie, faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou, ALGERIE, 71p.

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

Aprifel. ; (2020) Pesticides, risques et sécurité alimentaire Aprifel Agence pour la recherche et l'information en fruit et légumes frais 60, rue du Fb Poissonnière –75010 PARIS p 132-134)

Bénit P, Bortoli S, Chrétien D, Rak M, Rustin P(2018) . Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs. Rev Francoph Lab. 1 avr 2018;2018(501):49-57.

Bénit P., Chrétien D., Rak M. et al. (2018) Une révolution urgente semble nécessaire dans l'usage des antifongiques. Libération [Internet]. 15 avr 2018 [cité 23 févr 2019]; Disponible sur:

https://www.liberation.fr/debats/2018/04/15/une-revolution-urgente-semble-necessaire-dans-l-usage-des-antifongiques_

-Cooper J, Dobson H (2007), the Benefits of Pesticides to Mankind and the Environment. Crop Protection, 26, 1337-1348.

Damalas C A (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essays*, 4, 945-949.

Dorothee BATSCH., 2011, L'impact des pesticides sur la santé humaine, Doctorat en Pharmacie, faculté de pharmacie, université Henri Poincaré - Nancy 1, France, 07, 22-27 P

FRAC; (2019) | Introduction and General Information [Internet]. Fungicide Resistance Action Committee. [Cité 1 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides>

THOMAS E. (2013) Conférence internationale sur les maladies des plantes, Les fongicides de demain,<http://www.mon-viti.com/content/conference-internationale-sur-les-maladies-des-plantes-les-fongicides-de-demain> (cité le 10/08/13).

Gueddou A & Nedjaa Kh, 2017. Evaluation de la toxicité des pesticides par l'utilisation d'un biotest master en biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université A. MIRA – Bejaia, Algérie, 04 p

J.-J. Brière, J. Favier, V. El Ghouzzi, F. Djouadi, P. Bénit, A.-P. Gimenez, P. Rustin. Review – (2005) Succinate dehydrogenase deficiency in human. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2317–2324

KHEDDAM BENADJAL N., 2012. Enquête sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre *Meloidogyne incognita* (Nematoda : Meloidogynidae). Mémoire de magister, École nationale supérieure agronomique EL Harrach-Alger, 81p.

LEVEAU P., 2016. Intoxication aigues par des produits phytosanitaires chez l'enfant. *Journal Européen des urgences et réanimation*, -203,7p.

REGNAULT-ROGER C 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. 2005. *Ed : Tek & Doc.* 1013p.

Rustin P., Benit P., Bortoli S., Prud'homme L., Toutut-Picard E, 2019. Assemblée nationale ~ Compte rendu de réunion de la commission d'enquête sur l'alimentation industrielle : qualité nutritionnelle, rôle dans l'émergence de pathologies chroniques, impact social et environnemental de sa provenance [Internet]. Assemblée nationale; 2018 mai [cité 14 mars 2019] p. 1-15. Report No.: Séance de 11 heures Compte rendu n° 5. Disponible sur: http://www.assemblee-nationale.fr/15/cr-cealimindu/17-18/c1718005.asp#P3_197.

Technique Agricole. France. pp. 820.

Annexes

Annexe1

Plos One Un rapide aperçu (adaptation avec réorganisation des images augmentée d'encarts explicatifs supplémentaires ; P Bénit & P Rustin)

Cette étude scientifique, qui porte sur les SDHI, les **Inhibiteurs de la Succinate DésHydrogénase** (la SDH ou complexe II, une enzyme des mitochondries, impliquée dans la respiration des cellules),

- Confirme, en l'étendant à 8 des SDHI utilisés en France, le caractère général de l'effet des SDHI : quelques soient les espèces où ont été testée les SDHI, la SDH a été inhibée ;
- Dévoile une cible nouvelle des SDHI de dernière génération, le complexe III ;
- Montre la toxicité des SDHI sur des cellules humaines en culture, toxicité masquée par les conditions utilisées dans les tests réglementaires;
- Montre la capacité des SDHI à induire un stress oxydatif dans les cellules humaines ;
- Souligne l'hypersensibilité des cellules de malades dont les mitochondries fonctionnent déjà mal soit du fait d'une maladie causée par un déficit partiel de la SDH, soit d'une maladie neurologique (ataxie de Friedreich) ou encore neurodégénératives (maladie d'Alzheimer)

Dans la conclusion, les auteurs soulignent que l'usage immodéré, préventif, de produits sans aucune spécificité comme les SDHI en font des candidats de premier plan dans la perte de biodiversité désormais constatée.

Ils indiquent également la menace que cet usage fait peser sur l'homme dans 10, 20 ans (délais d'expression des maladies mitochondriales) cela pour un bénéfice/ risque nullement établi.

Sensibilité de la chaîne respiratoire mitochondriale aux pesticides SDHI et conséquence sur les cellules humaines en culture

Paule Bénit¹, Agathe Kahn¹, Dominique Chrétien¹, Sylvie Bortoli², Laurence Huc³, Manuel Schiff^{1,4}, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{5,6}, Judith Favier⁶, Pierre Gressens^{1,4}, Malgorzata Rak¹,

Pierre Rustin¹ *

¹Université de Paris, NeuroDiderot, INSERM, F-75019 Paris, France. ²Université de Paris, INSERM, UMR-S 1124, F-75006 Paris, France. ³INRA UMR 1331 ToxAlim (Centre de recherche en toxicologie alimentaire), Université de Toulouse, ENVT, INP, UPS, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027, France.

⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Robert Debré, Service de neurologie et maladies métaboliques, F-75019 Paris, France. ⁵Université de Paris, PARCC, INSERM, Equipe Labellisée par la Ligue contre le Cancer, F-75015 Paris, France. ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France

*Correspondance : Pierre Rustin, Inserm UMR 1141, Bât. Bingen, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019, Paris, France

Résumé

Les Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase (SDH) (SDHI) sont utilisés dans le monde entier pour limiter la prolifération de moisissures sur les plantes et leurs produits. Toutefois, la SDH, également appelé complexe II de la chaîne respiratoire, est un composant universel des mitochondries qui sont présentes dans quasi tous les organismes vivants. La SDH est restée particulièrement conservée au cours de l'évolution, et l'on peut légitimement s'interroger sur la spécificité des SDHI vis-à-vis des seules moisissures. Ici, nous établissons d'abord que la SDH de l'homme, de l'abeille domestique, du ver de terre et des champignons sont toutes sensibles aux huit SDHI testés, avec toutefois des valeurs d'IC₅₀ variables, généralement de l'ordre du micro-molaire. Nous avons ensuite observé que cinq des SDHI, principalement de la dernière génération, inhibent, outre la SDH, l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire. Puis, nous montrons que le glucose présent dans les milieux de culture cellulaire masque totalement l'effet délétère des SDHI. En effet, le glucose métabolisé par la glycolyse va fournir suffisamment d'ATP et de pouvoir réducteur (NADPH) pour les enzymes antioxydantes et ainsi permettre la croissance de cellules déficientes en chaîne respiratoire. En revanche, lorsque la glutamine est la principale source de carbone au lieu du glucose, la présence de SDHI entraîne une mort cellulaire dépendante du temps. Ce processus est considérablement accéléré pour des fibroblastes provenant de patients atteints de maladies neurologiques ou neurodégénératives dues à une altération de la chaîne respiratoire (encéphalopathie due à un déficit partiel de SDH) et/ou à une hypersensibilité aux stress oxydatifs (ataxie de Friedreich, forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer).

Introduction

La succinate déshydrogénase (SDH; EC 1.3.5.1), également appelée complexe II (CII) de la chaîne de transport d'électrons, est un composant universel et clé de la chaîne respiratoire mitochondriale de tous les organismes vivants (encadrés 1) [1]. Cette protéine transfère les électrons issus de l'oxydation du succinate en fumarate à un pool dédié d'ubiquinone, cela sans

extrusion concomitante de protons. Le complexe SDH est composé de quatre protéines (SDHA-D) largement conservées au cours de l'évolution (encadré 2) [2]. Dans le cycle de Krebs (Fig 1 et Fig 1 suppl), la SDH est la seule enzyme des mitochondries à ne pas avoir d'équivalent dans aucun autre compartiment cellulaire ni de cofacteur redox soluble, tel que NAD⁺/NADH, qui puisse être éventuellement compensée par l'activité d'autres déshydrogénases; ainsi, la SDH est unique



Dossier scientifique

Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs

Paule Bénit^{1,2}, Sylvie Bortoli^{3,4}, Dominique Chrétien^{1,2}, Malgorzata Rak^{1,2} et Pierre Rustin^{1,2,*}

¹ INSERM UMR1141, Hôpital Robert Debré, Bâtiment Bingen, 48, Boulevard Sérurier, 75019, Paris, France.

² Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR1141, 75019, Paris, France.

³ INSERM UMR 1124, 75006, Paris, France.

⁴ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UFR des Sciences Fondamentales et Biomédicales, 75006, Paris, France.

*Auteur correspondant : pierre.rustin@inserm.fr (P. Rustin).

RÉSUMÉ

Chez l'homme, les dysfonctions des enzymes du cycle de Krebs liées à des mutations causent des encéphalopathies sévères du jeune enfant, ou différents types de tumeurs et de cancers touchant différents organes. Ainsi des mutations des gènes de la succinate-déshydrogénase ont été identifiées dans des formes familiales de phéochromocytomes et paragangliomes. Les mutations du gène de la fumarase s'observent dans des léiomyomes utérins en association avec des cancers rénaux, mais des cas d'encéphalopathies de l'enfant ont aussi été observés. Les mutations des gènes de l'isocitrate-déshydrogénase peuvent représenter jusqu'à 20 % des leucémies myéloïdes aiguës et jusqu'à 80 % dans certains gliomes. On ne sait actuellement expliciter la diversité des conséquences possibles de ces mutations : encéphalopathies versus cancers, nature des tissus affectés, cinétique variable d'apparition des symptômes. Il semble en revanche établi que les anomalies dans les équilibres métaboliques qui résultent de ces mutations soient à la base des processus tumoraux en modulant l'activité d'hydroxylases susceptibles d'affecter certains facteurs de transcriptions, mais aussi la méthylation de l'ADN et les histones. Dans ce contexte, il semble étonnant que soient largement utilisés certains fongicides dont l'effet est de bloquer une étape centrale du cycle de Krebs, la succinate-déshydrogénase. Le principe de précaution voudrait sans aucun doute de réévaluer urgemment la nécessité de l'usage de telles substances pour l'homme et l'environnement.

ABSTRACT

Human diseases resulting from Krebs cycle impairments

In humans, dysfunctions of Krebs cycle enzymes caused by genetic mutations result either in severe encephalopathies of the young child, or in the appearance of different types of tumors and cancers affecting diverse organs. Thus mutations of the succinate dehydrogenase genes have been identified in familial forms of pheochromocytomas and paragangliomas. Most of the mutations in the fumarase gene are found in uterine leiomyomas in association with renal cancers, but cases of childhood encephalopathies have also been observed resulting from mutations affecting the same gene. Isocitrate dehydrogenase gene mutations account for up to 20 % of acute myeloid leukemias, and up to 80 % in some gliomas. So far we cannot explain the diversity of the possible consequences of these mutations: encephalopathies versus cancers, the different tissues that are affected and the variable kinetics of appearance of symptoms. On the other hand, it seems now established that the abnormalities in the metabolic equilibria that result from these mutations are at the basis of the tumor processes by modulating the activity of a number of hydroxylases that may affect the fate of certain transcription factors, but also the DNA and histone methylation. In this context, it seems surprising that some fungicides that are now widely used, block a central stage of the Krebs cycle, namely the succinate dehydrogenase. The principle of precaution would impose to urgently re-evaluate the need for the use of these substances in consideration of human health and the environment.

MOTS CLÉS

- acides organiques
- cancers
- mitochondries
- neuropathies
- SDHI

KEY WORDS

- cancers
- mitochondria
- neuropathies
- organic acids
- SDHI

© 2018 – Elsevier Masson SAS
Tous droits réservés.

► Introduction

Véritable plaque tournante du métabolisme des acides organiques dans toutes les cellules, le cycle de Krebs localisé dans les mitochondries a depuis longtemps été montré comme fondamental pour la vie cellulaire [1,2]. Pour ne citer que quelques-unes de ses fonctions :

- il fournit à la chaîne respiratoire une partie des équivalents réduits nécessaire à la synthèse d'ATP;
- une autre partie des équivalents réduits sont exportés hors des mitochondries dans certaines conditions de stress et vont accélérer la synthèse de NADPH et de glutathion;
- en assurant une intense activité métabolique, il participe à la production mitochondriale de chaleur;
- il est crucial dans la production d'intermédiaires métaboliques essentiels pour diverses réactions anaboliques extra-mitochondriales;
- à partir du pyruvate essentiellement produit par la glycolyse, il produit les métabolites nécessaires à la biosynthèse des purines et de divers acides aminés. Il n'est donc pas vraiment étonnant que toute dysfonction majeure du cycle ait longtemps été jugée incompatible avec la vie [3].

De fait, même la mise en évidence d'une accumulation majeure et spécifique d'un acide organique, par exemple celle du fumarate dans certaines neuropathies, ne semblait pas justifier de s'intéresser à une dysfonction primaire d'une enzyme du cycle, comme étant une cause possible d'une maladie humaine [4]. Cette époque est désormais bien révolue ! En effet depuis les années 90, la description d'un nombre, certes limité (moins de 300 cas rapportés), de cas de mutations délétères dans des atteintes neurologiques affectant des gènes codant des enzymes du cycle de Krebs, a démontré que la vie cellulaire reste compatible avec des dysfonctions notables de ce cycle, avec les premières mutations rapportées dans le gène de la fumarase, puis de la succinate-déshydrogénase (SDH) dans deux cas d'encéphalopathies sévères de l'enfant [5,6]. Désormais, l'identification de mutations dans des gènes codant sept des huit protéines du cycle de Krebs comme étant l'origine, outre celle connue d'encéphalopathies de l'enfant, de différents types de processus tumoraux (plusieurs milliers de cas) a changé la donne [7-11], et a permis de réaffirmer l'importance cruciale de ce cycle et des voies métaboliques auxquelles il est associé. Elle a mis en évidence d'une part le rôle primaire de telles mutations dans un type distinct de pathologie humaine, les pro-

cessus tumoraux, et d'autre part, a fait de ces mutations dans différents gènes du cycle une cause reconnue et nettement plus fréquente de maladies humaines.

Le cycle de Krebs, une vue de l'esprit ?

Avec la description des différents phénotypes associés aux mutations dans les gènes du cycle, il est rapidement apparu que les fonctions et caractéristiques du cycle de Krebs, ainsi que le rôle des intermédiaires métaboliques qu'il inter-convertit, étaient loin d'être réductibles au schéma traditionnellement admis [12,13].

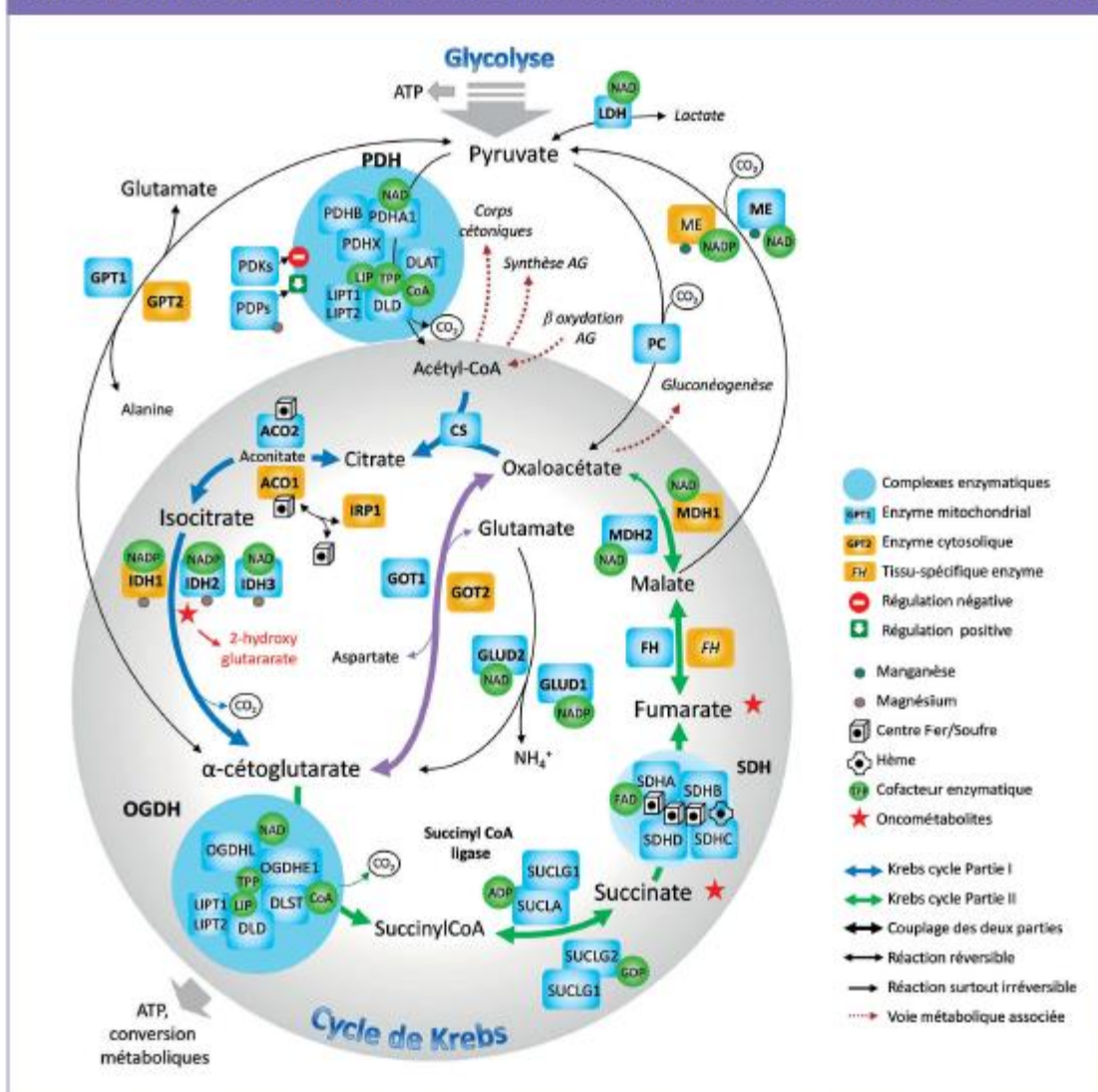
Du regroupement de huit protéines impliquées dans le cycle tel qu'initialement décrit par Hans Adolf Krebs [1,2] et travaillant de concert pour métaboliser l'acétyl-CoA, il convient de noter que les études de flux métaboliques ont montré que le cycle devrait en être en fait considéré comme deux entités distinctes [12,14]. Chacune de ses deux entités, connectées par l'intermédiaire d'une transaminase (*figure 1*), est caractérisée par un flux cinétique propre, une situation incompatible avec un fonctionnement à travers une unique entité. Si l'on y ajoute la redondance d'une partie des protéines du cycle dans les compartiments mitochondriaux et cytosoliques, sa sollicitation changeante en fonction des besoins métaboliques et des situations pathologiques, éventuellement variables dans le temps et dans l'espace d'un organisme vivant, il devient évident que l'unicité du cycle telle qu'elle a été décrite avec une organisation rigide, doit sans doute être reconsidérée. Finalement, le continuum métabolique autour des acides organiques du cycle implique d'intégrer à toute réflexion sur les pathologies associées, des gènes dont les produits constituent des partenaires à part entière du cycle (comme la pyruvate-déshydrogénase, par exemple). Conformément à cette dernière observation, l'étude des pathologies associées aux mutations des gènes des voies métaboliques directement afférentes et efférentes (*figure 1*) montre la similitude avec celles associées aux mutations des gènes codant les protéines du cycle de Krebs proprement dit.

Deux univers de maladies humaines

Des mutations dans plus d'une quinzaine de gènes de ces chaînons métaboliques sont ainsi connues comme étant à l'origine de pathologies humaines, incluant les gènes codant les protéines du cycle *sensu stricto* (*tableau 1*). Ces mutations correspondent

Le cycle de Krebs localisé dans les mitochondries a depuis longtemps été montré comme fondamental pour la vie cellulaire

Figure 1. Table tournante du métabolisme cellulaire, l'organisation complexe du cycle de Krebs.



Le cycle de Krebs (figurant sur le disque gris) est ici complété par les principales voies métaboliques afférentes et efférentes qui pour partie peuvent donner lieu à une tissu-spécificité plus ou moins marquée. De façon identique, l'organisation même du cycle, en particulier dans ses aspects quantitatifs, pourrait varier selon les tissus considérés. Ainsi, la cinétique de conversion depuis l'oxaloacétate jusqu'à l' α -cétoglutarate (en bleu) s'est avérée différente de la conversion de l' α -cétoglutarate jusqu'à l'oxaloacétate (en vert), un déséquilibre permis par la réaction de transamination (GOT, en violet) [14]. Notez l'accumulation anormale d'un oncométabolite particulier, le 2-hydroxy-glutarate, en cas de mutation affectant l'isocitrate-déshydrogénase [29].

Abbreviations: ACO, aconitase; ADP, adénosine-diphosphate; AG, acides gras; CoA, coenzyme A; CS, citrate-synthase; DLAT, dihydrolipoamide-S-acétyl-transférase (E2); DLD, dihydrolipoamide-déshydrogénase (E3); DLST, dihydrolipoamide-S-succinyl-transférase (E2); FH, fumarate-hydratase; GDP, guanosine-diphosphate; GTP, glutamate-pyruvate-transaminase; GOT, glutamate-oxaloacétate-transaminase; GLUD, glutamate-déshydrogénase; IDH, isocitrate-déshydrogénase; IRP, iron-responsive protein; LDH, lactate-déshydrogénase; LIP, acide lipoiq; LIPT1, 2-lipoyl-transférase; MDH, malate-déshydrogénase; ME, enzyme malique; NAD, nicotinamide-adénine-dinucléotide; NADP, nicotinamide-adénine-nucléotide-phosphate; OGDH, oxoglutarate-déshydrogénase (α -cétoglutarate-déshydrogénase; OGDHE1, E1; OGDHL, E1-like); PC, pyruvate-carboxylase; PDH, pyruvate-déshydrogénase (PDHA1 et PDHB, respectivement sous-unités α et β d'E1); PDHX, pyruvate-déshydrogénase composé X; PDKs, pyruvate-déshydrogénase-kinases; PDP, pyruvate-déshydrogénase-phosphatase; TPP, thiamine-pyrophosphate; SDH, succinate-déshydrogénase; SUCL, succinylCoA-ligase.



Tableau I. Les maladies associées aux mutations touchant les enzymes du cycle de Krebs ou fonctionnant de concert.

Enzyme déficitaire	Gene	Phénotype tumoral	Maladies autres
Pyruvate-déshydrogénase	PDHA1		Depuis l'acidose lactique précoce fatale jusqu'à une maladie neurologique chronique
	DLAT (PDHA2)		Microcéphalie et retard mental
	PDHB		Acidose lactique, hypotonie
	PDHX		Acidose lactique congénitale
	PDK1		
	PDK2		
	PDK3		
	PDK4	Résistance aux antiestrogènes dans le cancer du sein	Maladie de Charcot-Marie-Tooth dominante, liée à l'X
	PDP1		
	PDP2		Acidose lactique, Hypotonie
	P DPR		
	LIPT1		Syndrome de Joubert Acidose lactique précoce fatale, Maladie de Leigh
LIPT2		Encéphalopathie néonatale	
Phosphoénol-pyruvate-carboxykinase	PCK1		Défaillance hépatique sévère
	PCK2		Hypoglycémie précoce Acidose lactique
Pyruvate-carboxylase	PC		Acidose lactique avec retard développemental ou mortalité
Citrate-synthase	CS	Possible dérégulation dans différents cancers : surexpression rapportée dans des adénocarcinomes ovariens, perte de fonction dans des carcinomes cervicaux	
Aconitase Synthèse Centre Fer-Soufre (déficit multiple)	ACO1		
	ACO2	Association possible dans certains cancers gastriques et dans des cancers de la prostate	Dégénérescence cérébelleuse-rétinale de l'enfant
	FXN		Neuropathie optique isolée ou syndromique
	ISCU NFUI		Ataxie de Friedreich Myopathie Encéphalopathie fatale de l'enfant et/ou hypertension pulmonaire
Isocitrate-déshydrogénase	IDH1	Glioblastome Leucémie myéloïde sévère Chondrosarcome, Cholangiocarcinome	Convulsions ajoutées au gliome
	IDH2	Glioblastome Chondrosarcome Cholangiocarcinome	Acidurie D-2-hydroxyglutarique
	IDH3A		Encéphalopathie sévère de l'enfant.
	IDH3B		Rétinite pigmentaire
	IDH3G		
α-cétoglutarate-déshydrogénase	OGDHE1	Cancer colorectal	
	OGDHL		
	DLST		
	DLD		Encéphalopathie sévère
	LIPT1		Acidose lactique précoce fatale
	LIPT2		Maladie de Leigh Encéphalopathie néonatale

Tableau I (suite). Les maladies associées aux mutations touchant les enzymes du cycle de Krebs ou fonctionnant de concert.

Enzyme déficitaire	Gene	Phénotype tumoral	Maladies autres
Succinyl-CoA-ligase	SUCLG1		Encéphalomyopathie
	SUCLG2		.
	SUCLA2		Encéphalomyopathie Dystonie et surdité
Succinate-déshydrogénase	SDHA	Adénome hypophysaire et paragangliome/ phéochromocytome Carcinome rénal	Syndrome de Leigh Atrophie optique et ataxie
	SDHB	Paragangliome, Phéochromocytome Carcinome du rein Tumeur gastro-intestinale Syndrome de Carney-Stratakis Syndrome de Cowden	Leukodystrophie
	SDHC	Cancer du rein à cellules claires Paragangliome, Phéochromocytome Syndrome de Carney-Stratakis	
	SDHD	Paragangliome, Phéochromocytome Syndrome de Carney-Stratakis Cancer du rein Syndrome de Cowden Paragangliome, Phéochromocytome	Encéphalomyopathie
	SDHAF1 SDHAF2 SDHAF3 SDHAF4		Leukoenc�phalopathie infantile
Fumarase	FH	Syndrome HLRCC (fibrome utérin héréditaire et cancer à cellule rénales papillaires) Tumeurs rénales Paragangliome, Phéochromocytome	Encéphalopathie, convulsions, faiblesse musculaire
Malate-déshydrogénase	MDH1		
	MDH2	Paragangliome	Encéphalopathie infantile
Enzyme malique	ME1 NADP	Cancer colorectal	
	ME2 NAD	Cancer du pancréas	
	ME3 NADP	Mélanome cutané	
Glutamate-oxaloacétate-transaminase	GOT1		Macro-aspartate transaminase familiale
	GOT2	Favorise l'apparition de phéochromocytome	
Glutamate-pyruvate-transaminase	GPT1		
	GPT2	Cancer du sein	Diabète insulino-dépendant, microcéphalie, paraplégie spastique
Glutamate-déshydrogénase	GLUD1		Syndrome spinoc�r�belleux
	GLUD2		Hyperinsulin�mie, hypoglycémie

à différentes entités pathologiques qui peuvent intervenir à tous les âges de la vie et toucher différents organes [15]. Pour une part des présentations cliniques, en particulier celles historiquement décrites les premières dans les années 90, on observe de façon fréquente des atteintes neurologiques de l'enfant (**tableau 1, colonne 4**) [13]. Celles-ci sont très similaires à celles observées pour les atteintes des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale [16] qui sont supposées avoir pour conséquence un déficit énergétique lié à une synthèse défectueuse d'ATP, et/ou des anomalies dans l'utilisation de l'oxygène résultant en la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (superoxydes) [12]. Le manque d'ATP et l'excès de superoxydes sont connus pour favoriser nécrose et apoptose et à ce titre ils constituent une trame pour expliciter une partie des atteintes, nécrose tissulaire et dysfonctions sévères observées dans ces atteintes essentiellement neurologiques [17]. Mais depuis les années 2000, une succession d'études a montré que des atteintes précisément dans ces mêmes gènes étaient à l'origine d'un tout autre type de maladies humaines résultant cette fois du développement de tumeurs et cancers [18]. Selon les gènes mutés, certains organes semblent plus particulièrement atteints (**tableau 1, colonne 3**).

Ainsi, les mutations des gènes codant pour la SDH conduisent le plus souvent à des paragangliomes (des tumeurs bénignes affectant essentiellement soit le système nerveux parasympathique: tumeurs des glomus au niveau de la tête et du cou; soit le système nerveux sympathique extra-surrénalien) ou des phéochromocytomes (tumeurs dans la médullosurrénale), alors que les mutations touchant la fumarase conduisent le plus fréquemment à des fibromes utérins (tableau 1). Il existe cependant un certain degré de chevauchement. Ainsi des cancers rénaux, ou des paragangliomes, peuvent être observés en liaison avec des atteintes génétiques impliquant les gènes codant la fumarase ou la SDH (**tableau 1**).

Il est à noter que dans ces processus tumoraux, les dysfonctions des enzymes sont la cause d'une prolifération cellulaire anarchique, s'éloignant, sans que l'on ne connaisse véritablement le mécanisme, des phénomènes de mort cellulaire mis en avant dans les encéphalopathies initialement décrites [13]. En effet s'il est possible pour les déficits en SDH d'opposer les déficits partiels mesurés dans les cas d'encéphalopathies [6] au déficit total mesuré dans les tumeurs [19], l'activité de la fumarase est réduite à quelques pourcents aussi bien pour les cas d'encéphalopathies que

pour les cancers associés [5,20]. Fréquemment et indépendamment de telles mutations génétiques, des dérégulations métaboliques favorisant la glycolyse aux dépens de l'activité du cycle de Krebs interviennent pour fournir les métabolites nécessaires à une prolifération rapide des cellules cancéreuses, ainsi que les cofacteurs nécessaires à leur lutte contre le stress oxydant (effet Warburg).

Quoique puisse être l'explication du devenir des cellules, mort ou prolifération, les atteintes des protéines du cycle de Krebs initialement considérées comme tout à fait exceptionnelles dans des pathologies non cancéreuses, se révèlent être plus fréquentes dans un contexte tumoral.

Retour sur le fondamental...

Une grande partie des avancées réalisées dans l'investigation de ces maladies a suivi le développement des techniques de biochimie puis surtout celui spectaculaire de la génétique.

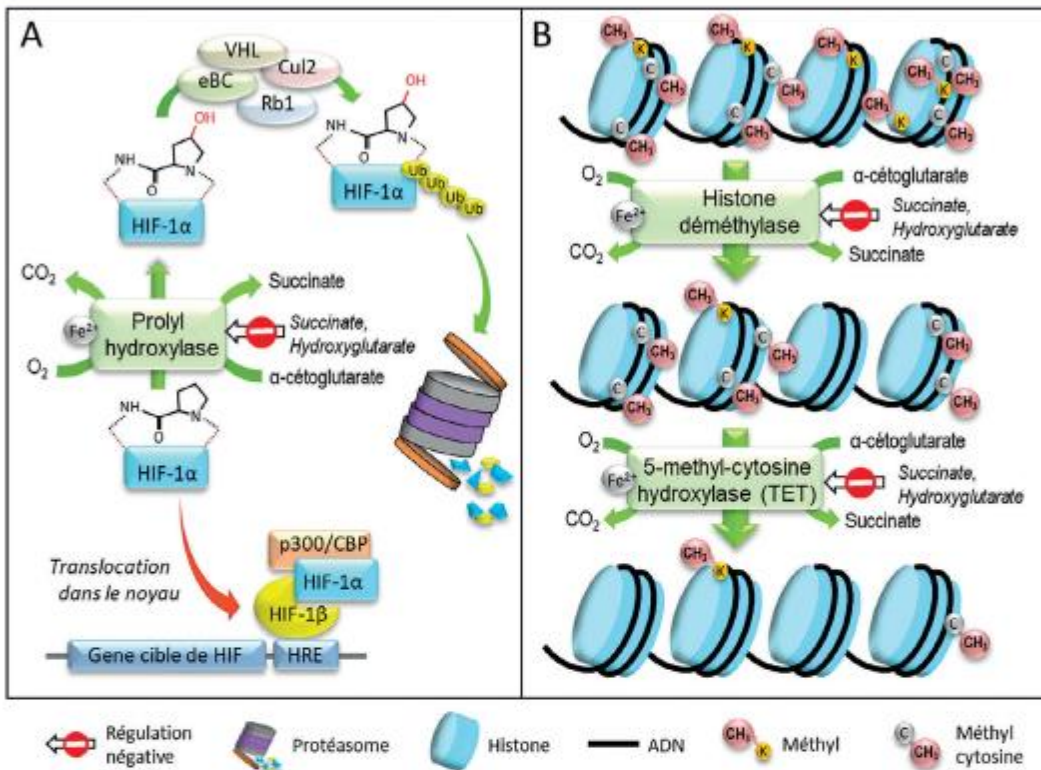
Mis au service de la médecine, les outils se révèlent tous les jours, plus efficaces pour permettre d'identifier plus facilement les mutations responsables de maladie dans les familles. Outre d'autoriser les diagnostics prénataux d'affections souvent graves, ces avancées permettent de toujours mieux comprendre ces maladies en attendant le jour espéré proche où il

deviendra possible de développer les thérapies efficaces qui manquent encore totalement.

Mais depuis quelques années, nous observons en outre un retour inattendu des travaux réalisés à l'occasion de l'investigation de ces pathologies vers des aspects très fondamentaux de la biologie cellulaire et de la biochimie. En effet, l'analyse des tumeurs résultant des mutations des enzymes du cycle de Krebs, où de cellules en culture porteuses de mutations touchant ces mêmes enzymes, a montré des anomalies spectaculaires dans les balances métaboliques contrôlées par l'activité des enzymes mutées [8,21], ou la production d'un métabolite particulier, l'hydroxyglutarate dans le cas des mutations affectant les gènes codant l'isocitrate-déshydrogénase (IDH) [9]. Tous ces métabolites accumulés anormalement dans les tumeurs sont désormais regroupés sous le terme d'oncométabolites. De fil en aiguille, les travaux ont montré que ces balances étaient des facteurs cruciaux dans les régulations épigénétiques, en particulier par la régulation de différentes hydroxylases cellulaires. Ainsi la prolyl-hydroxylase contrôlant la dégradation du facteur HIF1 α , et ainsi l'ensemble des voies de signalisation qui dépendent de ce facteur, se trouve inhibée par l'accumulation de succinate dans le cytosol des cellules (**figure 2A**). Un mécanisme similaire amène l'inhibition

Les mutations des gènes codant pour la SDH conduisent le plus souvent à des paragangliomes ou des phéochromocytomes

Figure 2. Une partie des mécanismes intervenant dans la régulation épigénétique contrôlée par les acides organiques.



A- La dégradation continue de la protéine HIF-1 α , facteur de transcription dont l'activation est liée à l'hypoxie, par le protéasome (à droite) est dépendante de son ubiquitination par un complexe protéique (VHL, eBC, Cul2, Rbx1, en haut). Cette réaction qui requiert de l'oxygène dépend de l'hydroxylation initiale de HIF-1 α par la prolyl-hydroxylase. En condition d'anaérobiose, HIF-1 α se localise dans le noyau des cellules où il participe à la régulation transcriptionnelle d'une série de gènes cibles (la voie HIF), incluant des gènes codant des enzymes de la glycolyse. L' α -cétoglutarate et le succinate étant respectivement le substrat et le produit de la réaction, l'activité de la prolyl-hydroxylase sera contrôlée par la base entre ces deux acides organiques.

B- De façon identique, la balance de concentrations entre ces deux acides organiques va affecter les activités de l'histone-déméthylase (en haut) et de l'ADN-hydroxylase de la famille TET (en bas). La première activité module la méthylation des résidus lysine des histones, alors que la seconde va moduler la méthylation des résidus cytosine de l'ADN. La balance α -cétoglutarate/succinate, ainsi que l'accumulation de 2-hydroxy-glutarate en cas de mutation des gènes codant pour l'isocitrate-déshydrogénase, a été montrée instrumentale dans la formation des tumeurs chez l'Homme en modifiant les réactions de méthylation des histones et de l'ADN [22,29].

Abréviations: HIF, hypoxia-inducible factor ; eBC, ElonginB/C ; VHL, Von Hippel-Lindau ; Cul2, Culline

des oxygénases impliquées dans la méthylation tant des histones (histone-déméthylase) que de l'ADN (5-méthyl-cytosine-hydroxylase) (figure 2B) [22]. Bien que chacun des différents oncométabolites apparaisse pouvoir agir de façon différentielle selon les tissus et avoir éventuellement différentes cibles [11], leur rôle dans les régulations épigénétiques cellulaires est désormais admis. Par sa capacité à utiliser l'acétyl-CoA, le succinate et le fumarate, le cycle de Krebs intervient en outre très directement dans les modifications post-traductionnelles des protéines (succination, succinylation et acétylation) intervenant dans

le marquage épigénétique, dont celui des histones [13]. L'ensemble de ces balances entre métabolites, auxquels on ajoutera les métabolites du glutamate dont la glutamine, une source privilégiée d' α -cétoglutarate, apparaissent désormais comme des facteurs centraux dans les régulations épigénétiques. Depuis, ces dernières ont été montrées comme affectant non seulement la prolifération cellulaire mais aussi les processus de différenciation tels qu'étudiés désormais fréquemment à travers les iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*). Cette régulation de l'épigénétique par les acides organiques



du cycle de Krebs, citrate, succinate et fumarate en particulier, semble également jouer un rôle central dans la réponse aux stimuli pro-inflammatoires, les intermédiaires du cycle de Krebs intervenant alors comme molécules de signalisation et comme immuno-modulateurs [23]. Les mutations dans les gènes codant des enzymes du cycle de Krebs ne sont évidemment pas les seuls acteurs dans la promotion du phénotype tumoral, et si les avancées en génétique des 30 dernières années ont permis la mise en évidence de mutations causales permettant d'expliquer la transformation cellulaire (comme par exemple la SDH dans certains cas de gliomes), elles ne peuvent à elles seules rendre compte des dérégulations métaboliques qui se mettent en place au cours de tous les processus tumoraux. En effet, des interactions complexes dans les multiples voies de signalisation contrôlant le métabolisme peuvent conduire à une reprogrammation métabolique propice à l'expansion de cellules tumorales, avec en retour un retentissement sur l'activité du cycle de Krebs.

Conclusion

Plusieurs raisons justifient le renouveau d'intérêt que connaît le métabolisme des acides organiques du cycle de Krebs. D'une part les maladies trouvant leur source

dans des anomalies de ce métabolisme sont passées du statut d'extrêmement rares, à titre d'encéphalopathies de l'enfant pour l'essentiel, à celui de maladies dont l'extension va sans cesse croissante avec un nombre grandissant de tumeurs dont l'origine réside dans des mutations de gènes codant des enzymes du cycle de Krebs [13]. Ce sont les investigations menées dans ce cadre qui ont en particulier contribué à montrer le rôle central que les métabolites du cycle jouaient dans les régulations épigénétiques. Ce sont ces mêmes régulations dont on sait désormais qu'elles jouent un rôle tout aussi décisif dans la différenciation et la prolifération cellulaire [24].

Clairement, le rôle de plaque tournante pour la vie cellulaire attribuée au cycle de Krebs reste plus que jamais d'actualité. En outre, il semble désormais raisonnable de penser que toute altération anormale et continue des balances entre métabolites du cycle de Krebs, favorisée bien sûr à l'extrême par des mutations génétiques, mais aussi par des conditions externes défavorables, en particulier par l'exposition à certains polluants environnementaux, puisse avoir sur le long terme des conséquences (neuropathies, cancers) que nous ne faisons que juste entrevoir.

Dans ce contexte, on peut s'étonner que parmi les fongicides de dernière génération actuellement recommandés dans le monde pour améliorer les rendements de la culture des graminées (blés et autres céréales), la conservation des fruits, ou... faciliter l'entretien des pelouses de golf (figure 3), figurent des agents (SDHIs, inhibiteurs de la SDH) qui visent directement une enzyme du cycle de Krebs [25]. Initialement, les premiers SDHIs ont été introduits dans les années 60, mais à l'époque ils n'ont pas eu une diffusion extensive du fait de leur efficacité limitée [26]. Une seconde génération de fongicides SDHI destinés à la protection des récoltes a été mise sur le marché après les années 2000 visant à traiter un grand spectre de maladies des plantes, le Boscalid étant le premier et réputé le plus efficace de ces antifongiques. Les SDHIs sont désormais utilisés à grande échelle (70% des surfaces traitées de blé tendre et 80% en orge d'hiver en 2014 (JY Maufas); 90% des surfaces prévues en 2021 (AS Le Gall); interviews sur le site <https://www.terre-net.fr>). Bien sûr, l'affinité pour, et le positionnement dans, leur cible (la SDH) de ces inhibiteurs SDHIs, ainsi que leur captation par les cellules, facteurs dont dépendra l'inhibition, varient selon les espèces vivantes étudiées. En particulier, les sous-unités C et D diffèrent notablement de leurs équivalents dans diverses espèces [27]. Cette différence a été invoquée pour rendre compte de l'apparente innocuité chez l'homme. Malheureusement, les connaissances d'affinité ne concernent en réalité qu'un nombre infime d'espèces, restant testées sur des périodes courtes dans des conditions données. Ainsi, il apparaît déjà que les nématodes sont également sensibles à certains de ces SDHI

Figure 3. Entretien des pelouses de golf.



Les inhibiteurs de la succinate-déshydrogénase (regroupés sous le terme SDHI) sont parmi les plus fréquents des nouveaux fongicides utilisés contre les champignons des graminées (agriculture et loisirs). Reproduction d'une publicité sur le Web vantant en image l'usage des SDHI pour le gazon des golfs. Incrustés à l'image, les noms de plusieurs produits commerciaux contenant des SDHI.

© Pierre Ruzh

(Indemnify/fluopyram). Dès lors, sans même parler d'une éventuelle toxicité directe chez l'homme, ces traitements pourraient intervenir dans la diminution spectaculaire de la biomasse d'insectes rapportée récemment en Europe (plus de 75 % en 27 ans dans 63 zones protégées en Allemagne) [28], une disparition aux conséquences encore totalement imprévisibles. Chez l'homme une éventuelle toxicité pourrait être variable selon le fond génétique de chaque personne (les seuils de tolérance aux résidus des SDHI admis sont de 3 mg kg⁻¹ pour la tomate, pour s'élever à 10 mg kg⁻¹ pour la pomme ou les framboises, et jusqu'à 60 mg kg⁻¹ pour les épinards) [26]. Le principe de précaution devrait sans doute conduire à réduire au strict minimum, ou mieux à proscrire, l'usage de tels agents qui visent des voies cruciales du métabolisme et présentes chez tous les organismes vivants, comme le cycle de Krebs. ■■

Liens d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Points à retenir

- ✦ À l'instar de nombre de dysfonctions mitochondriales, les anomalies du cycle de Krebs résultant de rares mutations génétiques sont susceptibles de causer des atteintes neurologiques majeures chez l'enfant.
- ✦ Plus fréquemment, elles sont à l'origine de différentes tumeurs et cancers affectant différents organes du corps humain.
- ✦ Les anomalies du cycle de Krebs par le fait qu'elles perturbent les balances métaboliques dans les cellules sont susceptibles de moduler l'épigénétique cellulaire et ainsi d'entraîner la cellule vers des processus tumoraux.
- ✦ Le contrôle de l'épigénétique par les acides organiques en fait désormais un vaste sujet d'étude pour les processus de prolifération et de différenciation.
- ✦ Dans ce contexte, le principe de précaution devrait conduire à revoir urgemment l'idée de bloquer une étape clef du cycle de Krebs, celle catalysée par la succinate-déshydrogénase, pour obtenir une action antifongique en agriculture

Références

- [1] Krebs H, Johnson WA. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. *Enzymologia* 1937;4:148-56.
- [2] Krebs HA, Salvin E, Johnson WA. The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem J* 1938;32:113-7.
- [3] Tyler D (1992) *The Mitochondrion In Health and Diseases*. New York: VCH Publishers, Inc. 1-557 p.7
- [4] Whelan DT, Hill RE, McClorry S. Fumaric aciduria: a new organic aciduria, associated with mental retardation and speech impairment. *Clin Chim Acta* 1983;132:301-8.
- [5] Bourgeron T, Chrétien D, Poggi-Bach J, et al. Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency. *J Clin Invest* 1994;93:2514-8.
- [6] Bourgeron T, Rustin P, Chrétien D, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995;11:144-9.
- [7] Favier J, Brière JJ, Strompf L, et al. Hereditary Paraganglioma/Pheochromocytoma and Inherited Succinate Dehydrogenase Deficiency. *Horm Res* 2006;63:171-79.
- [8] Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7:77-85.
- [9] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462:739-44.
- [10] Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002;30:406-10.
- [11] Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, et al. Oncometabolite-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer* 2014;135:2237-48.
- [12] Rustin P, Bourgeron T, Parfait B, et al. Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochim Biophys Acta* 1997;1361:185-97.
- [13] Bénit P, Letouze E, Rak M, et al. Unsuspected task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1837:1330-7.
- [14] Yudkoff M, Nelson D, Dalkhin Y, et al. Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J Biol Chem* 1994;269:27414-20.
- [15] Brière JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, et al. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1114-20.
- [16] Turnbull DM, Rustin P. Genetic and biochemical intricacy shapes mitochondrial cytopathies. *Neurobiol Dis* 2015;92:55-63.
- [17] Rustin P, Kroemer G. Mitochondria and cancer. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2007;1-21.
- [18] Sajani K, Islam F, Smith RA, et al. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie* 2017;135:164-72.
- [19] Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet* 2001;69:1186-97.
- [20] Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 2005;14:2231-9.
- [21] Brière JJ, Favier J, Bénit P, et al. Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 α nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* 2005;14:3263-9.
- [22] Letouze E, Martiniell C, Lortot C, et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 2013;23:739-52.
- [23] Ryan DG, O'Neill LAJ. Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. *FEBS Lett* 2017;591:2992-3006.
- [24] Carey BW, Finley LW, Cross JR, et al. Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2015;518:413-6.
- [25] Yamashita M, Fraaije B. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zyoseptoria tritici*. *Pest Manag Sci* 2017.
- [26] Abad-Fuentes A, Ceballos-Alcantarilla E, Mercader JV, et al. Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:4207-11.
- [27] Huang S, Millar AH. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 2013;16:344-9.
- [28] Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E, et al. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS One* 2017;12:e0185809.
- [29] Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19:17-30.

Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 15 janvier 2019

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

relatif à « l'évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI) »

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est saisie le 24 mai 2018 pour la réalisation de l'expertise suivante : Evaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans une tribune publiée le 16 avril 2018 dans la presse, plusieurs scientifiques ont souhaité alerter sur les risques potentiels pour la santé et l'environnement de l'usage en agriculture des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI). Dans ce contexte, l'Anses a confié l'analyse de ce signal à un groupe d'experts.

L'objectif de cette expertise est de déterminer si les informations et hypothèses scientifiques mentionnées par les auteurs d'une tribune sur les risques potentiels pour la santé de l'usage en agriculture des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI) apportent, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives fongicides concernées.

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 collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « SDHI » appuyé par les Unités d'Evaluation de la DEPR (Direction de l'Evaluation des Produits Réglementés) entre Juin et Décembre 2018. L'Unité Phytopharmacovigilance et Observatoire des résidus de pesticides (UPO) de la Direction de l'Evaluation des Risques (DER) a également été sollicitée.

Les scientifiques signataires de la tribune ont été auditionnés par le GECU lors de sa réunion du 14 juin 2018.

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 de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

Les SDHI ou Inhibiteurs de la Succinate Deshydrogénase sont des fongicides essentiellement utilisés sur céréales pour contrôler des maladies majeures de type septoriose, helminthosporiose, ramulariose, et en traitement de semences, les charbons et autres champignons non pythiacées. Ils sont également utilisés sur vigne, en arboriculture, grandes cultures (autres que céréales) cultures légumières et ornementales afin contrôler les maladies majeures de type sclérotinia, pourriture grise, phoma, et autres champignons de ce type.

A ce jour, 11 substances actives de cette famille entrent dans la composition de produits autorisés en France.

Sur la base des éléments détaillés dans son rapport (annexe 2), le GECU note que :

- il n'est pas possible de répondre de manière définitive à toutes les questions et hypothèses identifiées auprès des chercheurs lanceurs de l'alerte,
- certaines de ces questions ou hypothèses renvoient à des réflexions communes à toutes les substances actives phytopharmaceutiques et d'autres produits chimiques réglementés : contexte réglementaire ne prévoyant pas l'exclusion de substances sur la base du danger hors CMR/PE, gestion des risques par application de seuils de toxicité, expositions cumulées, caractère prédictif des tests d'écotoxicologie pour les substances persistantes. En raison de leur caractère transverse à toutes les substances phytopharmaceutiques, ces questions ne constituent pas une alerte spécifique à la famille des SDHI,
- à l'inverse, certaines de ces questions ou hypothèses sont plus spécifiques à la famille des SDHI : sensibilité croisée des enzymes humaines et fongiques, introduction d'études ciblées en sus des études réglementaires minimales pour considérer les risques mitotoxiques, pertinence d'études de cancérogénèse chez le rongeur pour détecter des cancers imputables à une altération de la fonction SDH.

Cependant, les incertitudes résiduelles sont à mettre en relief avec :

- l'apparent respect des bonnes pratiques agricoles pour cette famille de substances, objectivé par le caractère exceptionnel des dépassements de LMR lors des nombreuses analyses et probablement soutenu par la nécessité de limiter l'émergence des résistances fongiques,
- la faiblesse des expositions alimentaires totales rapportées aux seuils toxicologiques actuellement connus et appuyés sur une batterie importante de tests, dont des tests de cancérogénicité réalisés chez le rat,
- le métabolisme important de ces substances conduisant à des doses internes faibles au regard de l'exposition externe,

- l'état actuel des connaissances scientifiques relatives à la plausibilité d'un effet cancérigène en présence d'inhibition, probablement réversible, de la SDH et/ou d'accumulation limitée de succinate,
- l'absence, en l'état actuel des données portées à sa connaissance, de réel signal d'alerte sanitaire en termes d'effets spécifiques observés pour les organismes de l'environnement,
- l'absence, en l'état actuel des données portées à sa connaissance, de réel signal d'alerte sanitaire en termes d'augmentation de l'incidence des cancers spécifiques associés au déficit en SDH, chez l'Homme non porteur de mutation (chez les professionnels exposés par exemple), malgré une commercialisation parfois ancienne de ces molécules.

Le GECU considère donc que les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la vigilance :

- n'apportent pas d'éléments en faveur d'une exposition qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées,
- mettent en évidence des incertitudes résiduelles sur des risques qui auraient pu ne pas être pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées. Ces incertitudes, en l'absence de signal d'alerte sanitaire, justifient les recommandations formulées au paragraphe ci-après.

Afin de lever certaines incertitudes résiduelles mises en évidence lors de l'étude des hypothèses scientifiques identifiées auprès des lanceurs de l'alerte, et plus généralement de renforcer la sécurité d'emploi des substances actives phytopharmaceutiques, le GECU préconise les recommandations suivantes, regroupées de manière thématique. Ces recommandations devraient être partagées au niveau européen, en cohérence avec les modalités d'évaluation des substances actives. Certaines de ces recommandations prévoient l'apport de connaissances nouvelles, pouvant nécessiter une ré-évaluation de la sécurité d'emploi des SA SDHI au fur et à mesure de leur production.

Afin de mieux caractériser les dangers des SA SDHI :

- caractériser les propriétés d'inhibition des SDHI, de leurs métabolites et produits de dégradation sur des enzymes humaines en utilisant des tests appropriés et en considérant des associations de SA au mécanisme d'action commun. Ces propriétés d'inhibition seront mises en regard des expositions internes estimées pour les consommateurs,
- caractériser les propriétés d'inhibition des SDHI, de leurs métabolites et produits de dégradation sur des enzymes des organismes non cibles. Ces propriétés d'inhibition seront mises en regard des expositions estimées pour ces organismes,
- développer l'utilisation d'outils de détection et caractérisation utilisables lors des évaluations réglementaires, pour les effets mitotoxiques.

Afin de mieux caractériser les expositions :

- poursuivre les plans de surveillance et de contrôle apportant des informations objectives sur l'exposition réelle de la population et des organismes de l'environnement et permettant de mettre en relief les données contenues dans les dossiers d'autorisation,
- ajouter d'autres substances actives SDHI dans les plans de surveillance et de contrôle et les futurs travaux de l'EAT, puis mettre à jour l'évaluation des risques a posteriori qui en découle,

- prendre en compte les expositions par voie aérienne lorsque ces données seront disponibles, notamment dans le cas du boscalid qui est le seul SDHI retenu dans le cadre du travail d'expertise relatif à la définition de modalités de surveillance des pesticides dans l'air.

Afin de mieux caractériser les risques associés aux SA, dont les SDHI :

- tester la faisabilité d'un suivi rétrospectif et prospectif de l'évolution de l'incidence de pathologies connues en lien avec des mutations « SDH » (registres),
- quantifier l'exposition interne des travailleurs et consommateurs exposés,
- poursuivre les travaux relatifs au développement de tests toxicologiques et écotoxicologiques plus sensibles, en lien avec le mécanisme d'action des substances actives,
- poursuivre les travaux d'expertise et de recherche sur le cumul des expositions pour un effet donné, prenant en compte jusqu'aux mécanismes d'actions toxiques communs. Dans le cas particulier des SDHI, cette approche devrait notamment être appliquée à des associations de fongicides inhibant la respiration mitochondriale, en particulier afin de documenter l'effet attendu sur des cellules humaines,
- poursuivre les efforts de création, de collecte et d'interprétation des données de phytopharmacovigilance afin de détecter les éventuels signaux découlant des usages des produits, sur l'ensemble du territoire national,
- développer l'utilisation ou le recours aux AOP (Adverse Outcome Pathway)¹ pour considérer les effets combinés des mélanges²

Afin de renforcer les dispositifs réglementaires existants :

- introduire des requis réglementaires sur la pertinence chez l'Homme et les organismes non cibles du mécanisme d'action pesticide des substances actives, sous réserve que la cible soit connue et présente chez l'Homme et/ou les organismes non cibles,
- considérer la possibilité d'identifier, à l'image de la génotoxicité, des effets toxiques pouvant justifier une précaution de principe équivalente à celle dont bénéficient, dans la réglementation, les substances CMR.
- considérer le recours plus systématique aux tests écotoxicologiques complexes simulant les conditions naturelles (cosmes),
- considérer la possibilité d'un suivi régulier des matrices non aqueuses (sols en particulier) afin de documenter l'imprégnation en substances actives et métabolites persistants et d'évaluer après la mise sur le marché, le possible risque écotoxique cumulé,
- Poursuivre l'intégration des approches cumulées dans les processus réglementaires d'évaluation.

¹ Séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable in vivo, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire

² Souders CL 2nd, Liang X, Wang X, Ector N, Zhao YH, Martyniuk CJ. High-throughput assessment of oxidative respiration in fish embryos: Advancing adverse outcome pathways for mitochondrial dysfunction. *Aquat Toxicol.* 199 (2018) 162-173.

Évaluation du signal concernant la toxicité des fongicides inhibiteurs de la succinate deshydrogénase (SDHI)

Saisine « 2018-SA-0113 »

RAPPORT d'expertise collective

« GECU SDHI »

Décembre 2018

AUTOSAISINE

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

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

Décide :

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

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

Il s'agit de déterminer si les informations et hypothèses scientifiques mentionnées par les auteurs d'une tribune sur les risques potentiels pour la santé de l'usage en agriculture des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) apportent, au regard des données de la littérature, des évaluations européennes des substances et des données issues de la phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives fongicides concernées.

1.2 Contexte de l'autosaisine

Dans une tribune publiée le 16 avril 2018 dans la presse, plusieurs scientifiques ont souhaité alerter sur les risques potentiels pour la santé de l'usage en agriculture des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI). Dans ce contexte, l'Anses mobilise son expertise afin de prendre en compte l'ensemble des données scientifiques disponibles sur ce sujet et notamment examiner sans délai les éléments évoqués par les scientifiques lanceurs d'alerte. L'analyse de ce signal est confiée à un groupe d'experts.

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

- Les informations et hypothèses scientifiques apportées par les lanceurs de l'alerte, apportent-elles au regard des données de la littérature et des données issues de la

phytopharmacovigilance, des éléments en faveur d'une exposition et de risques qui n'auraient pas été pris en compte dans l'évaluation des substances actives concernées?

- Si des éléments nouveaux sont mis en évidence, doivent-ils être portés au niveau européen et le cas échéant des mesures immédiates de gestion des risques pour les produits autorisés à base de ces substances ?
- Faire des recommandations pour les suites à donner à cette alerte.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

3 mois

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

Fait à Maisons-Alfort, le 24 mai 2018



Dr Roger Genet
Directeur général