

### Annexe 3. Revue de la littérature scientifique sur la génotoxicité du chlorpyrifos

La déclaration de l'EFSA du 31.07.2019 à la suite de la Peer Review de l'UE (EFSA, 2019c) indiquait qu'il n'était pas possible de déterminer des doses de référence pour le chlorpyrifos, compte tenu des effets observés en termes de mutagenicité et de neurotoxicité sur le plan du développement (ce qui a conduit à la proposition de classification en Repr. 1B).

Dans la Peer Review de l'UE, il a été déterminé que, sur la base de la majorité des études GLP de génotoxicité réglementaires présentées par le demandeur, le chlorpyrifos ne pouvait pas être classé comme génotoxique. Les essais sur les bactéries et les cellules de mammifères n'ont indiqué aucun potentiel de mutation génétique. Le chlorpyrifos a été testé négatif pour les aberrations chromosomiques à la fois *in vitro* et *in vivo*.

On trouve toutefois dans la littérature scientifique ouverte un certain nombre d'études (qui ont été jugées acceptables en dépit de certaines restrictions) qui contredisaient les études GLP, et il a été conclu de ce fait qu'un effet génotoxique potentiel n'était pas exclu.

Sur la base des études disponibles dans la littérature scientifique ouverte les données relatives à la génotoxicité ont fait l'objet d'une analyse plus approfondie afin de déterminer si une conclusion pouvait être tirée concernant un éventuel mécanisme d'action pour les effets observés dans ces études (Tableau 3).

Dans le rapport d'évaluation de l'UE, quatre essais *in vivo* tirés de la littérature scientifique ouverte sont passés en revue. Dans l'un d'entre eux (Abdelaziz *et al.*, 2010), les auteurs rapportent une incidence accrue d'aberrations chromosomiques tant dans les cellules de la moelle osseuse que dans les gamètes de la souris ♂ après une exposition à la substance active pendant 90 jours.

Dans les trois autres rapports, le test des comètes a révélé une augmentation de l'incidence dans différents tissus tels que les globules blancs, les hépatocytes et les cellules cérébrales (Kopjar *et al.*, 2018; Sandhu *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2008). Une publication fait état d'une augmentation de l'incidence des cellules binucléées et multinucléées, dont la pertinence génotoxicologique reste toutefois incertaine (Sandhu *et al.*, 2013).

Deux études *in vitro* ont fourni des preuves à l'appui. Dans Cui *et al.* (2011), les auteurs ont également constaté une augmentation de l'incidence de l'endommagement de l'ADN par le test des comètes, et de la synthèse d'ADN non programmée (UDS) dans les hépatocytes. Cependant, dans un article récent, non inclus dans le rapport d'évaluation de l'UE en raison de sa date de publication récente (Mužinić *et al.*, 2019), aucune augmentation de l'incidence des micronoyaux n'a été constatée dans les lymphocytes humains, mais des preuves de non-disjonction dans les cellules en interphase binucléées pour 4 chromosomes marqueurs différents, marqués avec la technologie FISH ou 'hybridation *in situ* en fluorescence'. Une explication concluante du fait paradoxal de l'interaction possible avec le système de division cellulaire/nucléaire sans formation de micronoyaux n'est pas donnée, mais il est suggéré qu'elle pourrait être due à un certain nombre de mécanismes moléculaires qui perturbent la cohésion des chromatides-sœurs pendant la division du noyau/cellule sans émission de chromosomes supplémentaires. Un système validé pour confirmer cela n'est pas encore suffisamment disponible. En outre, cette étude présente une lacune, à savoir qu'en raison du choix des concentrations d'essai, aucune concentration-réponse claire n'a été établie, ce qui rend l'étude peu concluante.

Tableau 3. Aperçu des principales données de la littérature sur la génotoxicité du chlorpyrifos.

Test type , GLP, Test substance (purity)	Test system, Route of administration (solvent), Duration, Concentrations / doses	Evaluation/ Result	Reference
<b>In vivo</b> comet assay: DNA damage, liver and brain (similar to OECD 489, no GLP) Chlorpyrifos purity not reported	♂ rats (Wistar) Intramuscular injection - not preferred) (solvent DMSO) Dose levels: 0, 50, 100 mg/kg bw/d for 1, 2 or 3 days, or 0, 1.12 or 2.24 mg/kg bw/d for 90 days.	Acceptable with restriction ↑ comet incidence brain + liver cells LOAEL (90d) = 1.12 mg/kg bw/d	Mehta <i>et al.</i> , 2008
<b>In vivo</b> chromosome aberration in somatic and germ cells (similar to OECD 475 and 483, no GLP) Chlorpyrifos purity not reported	♂ mice (Swiss Albino), oral gavage for 90 days (solvent <i>a.d.</i> , suboptimal given log $P_{ow} \sim 5$ ) Dose levels: 0, 0.5, 1, 2 mg/kg bw/d	Acceptable with restriction (positive control displays a relative low response) ↑ Chromosome aberration in somatic + germ cells. LOAEL (90d) = <b>0.5 mg/kg bw/d</b>	Abdelaziz <i>et al.</i> , 2010
<b>In vivo</b> nuclear abnormality (binuclear, multinuclear induction – non-standard) test and comet assay in lymphocytes (no guideline, no GLP) Chlorpyrifos purity 99.2%	♂ + ♀ rats (Wistar) Oral gavage (solvent corn oil) for 7 or 14 days Dose-levels: 0, 3 or 12 mg/kg bw/d	Acceptable with restriction ↑ binuclear, multinuclear cell incidence (geno- toxicological relevance?) ↑ comet incidence in lymphocytes LOAEL (14d) = 3 mg/kg bw/d	Sandhu <i>et al.</i> , 2013
<b>In vivo</b> comet assay: DNA damage, leukocytes and brain cells (similar to OECD 489, no GLP) Chlorpyrifos purity 99.9%	♂ rats (Wistar), oral gavage for 28 days (solvent EtOH except ctr: saline) Dose levels: 0, 0.01, 0.015, 0.160 mg/kg bw/d (=no significant AChE-inhibition in brain; no clinical signs; RBC AChE affected at all doses)	Acceptable with restriction (solvent ≠ in control <> treated animals) ↑ comet incidence in brain + leukocytes but concentration-dependence unclear LOAEL (28d) = 0.01-0.16 mg/kg bw/d (?)	Kopjar <i>et al.</i> , 2018
<b>In vitro</b> UDS assay (similar to OECD 482, no GLP) <b>In vitro</b> comet assay (similar to OECD 487, no GLP) <b>In vitro</b> test for DNA cytosine methylation Chlorpyrifos purity 95.6 %	Triplicate cultures of ICR mouse hepatocytes treated with chlorpyrifos (in DMSO) at 0, 3.1, 6.3, 12.5, 25 or 50 µg/mL.	Acceptable with restriction Concentration-related ↑ comet incidence in hepatocytes ↓ levels of 5-methylcytosine (DNA methylation assay, epigenetic effect?)	Cui <i>et al.</i> , 2011
<b>In vitro</b> cytome assay (similar to OECD 487, no GLP) <b>In vitro</b> FISH analysis of nondisjunction and aneuploidy in BN cells (chr #9, #18,X,Y) Chlorpyrifos purity not reported	Single (?) cultures of human lymphocytes treated with chlorpyrifos (in DMSO) at 0°, 0.000623°, 0.01666, 0.0262, or 3° µg/mL. (°: concentration tested in FISH)	Acceptable with reservation (only 1 ♂ donor, 1 culture/concentration) • No increase of micronuclei incidence, • ↑ chromosome gain/ loss/ mis-segregation with unclear concentration-dependence due to the large dose-spacing. Inconclusive.	Mužinić <i>et al.</i> , 2019 (not evaluated in EU-DAR)

Compte tenu des imperfections citées dans les différentes études publiées, les preuves ou « poids de la preuve » ('weight of evidence') d'une génotoxicité manifeste ne semblent pas très solides. En outre, la plupart des points-finaux, mais pas tous, tels que les tests UDS et les tests des comètes, sont souvent considérés comme de simples *indications* d'une génotoxicité potentielle, mais moins d'une interaction primaire claire avec le matériel génétique. Il convient également de noter que les études à long terme sur le chlorpyrifos n'indiquent pas de potentiel cancérigène, ce qui n'est pas une indication absolue mais une indication complémentaire de l'absence de fort potentiel mutagène de cette substance.

Sur la base des études présentées, il est difficile de soutenir qu'il existe des preuves convaincantes d'un effet mutagène spécifique du chlorpyrifos, malgré une certaine incertitude résiduelle, comme le traduit d'ailleurs la conclusion de l'EFSA (« ...all the experts agreed that these uncertainties should be considered in the risk assessment. ») (EFSA, 2019c).

D'un point de vue quantitatif, il est très difficile d'établir une NOAEL/LOAEL, étant donné la disparité des résultats. On pourrait proposer que la « LOAEL » la plus pertinente pour la génotoxicité soit fixée à 0,5 mg/kg pc par jour, bien qu'il s'agisse d'une étude où l'on a observé une clastogénicité (Abdelaziz *et al.*, 2010), ce qui contraste avec les points-finaux génotoxiques indirects tels que les effets aneugènes ou les lésions générales de l'ADN, et ne peut généralement pas être considéré comme un effet de seuil. La valeur trouvée dans Kopjar *et al.* (2018) est plus faible, mais compte tenu de l'espacement particulièrement faible des doses pas aussi fiable.

Dans une perspective plus large, cependant, il est raisonnable de supposer que le point-final le plus critique (et plus solidement démontré) n'est pas la génotoxicité, mais la neurotoxicité. Il est donc proposé de considérer la LOAEL pour la neurotoxicité développementale comme le point de référence pour la caractérisation du danger du chlorpyrifos.

## Références

- Abdelaziz, K.B., El Makawy, A.I., El-Abidin Abd Elsalam, A.Z., & Darwish, A.M. (2010). Genotoxicity of chlorpyrifos and the antimutagenic role of lettuce leaves in male mice. *Communicata Scientiae* 1, 137–145.
- Cui, Y., Guo, J., Xu, B., & Chen, Z. (2011). Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21, 70–74.
- Kopjar, N., Žunecb, S., Mendaš, G., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković, B.T., Milić, M., Pavičić, I., Čermak, A.M.M., Pizent, A., Vrdoljak, A.L., & Želježić, D. (2018). Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions* 279, 51–63.
- Mehta, A., Verma, R.S., & Srivastava, N. (2008). Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat liver and the brain. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49, 426–433.
- Mužinić, V., Ramić, S., & želježić, D. (2019). Chromosome missegregation and aneuploidy induction in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* by low concentrations of chlorpyrifos, imidacloprid and  $\alpha$ -cypermethrin. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60 (1), 72-84.
- Sandhu, M.A., Saeed, A.A., Khilji, M.S., Ahmed, A., Latif, M.S., & Khalid, N. (2013). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos: a gender related approach in regular toxicity testing. *The Journal of Toxicological Sciences* 38, 237–244.