

Publication par l'Anses des travaux non finalisés du groupe d'expertise collective en urgence sur le glyphosate de 2016.

- Notice d'accompagnement -

Contexte général de la mise à disposition d'un document d'expertise non finalisé

Lors du précédent cycle de réévaluation et d'approbation de la substance active phytopharmaceutique glyphosate, qui avait abouti en 2017 à une approbation européenne de cette substance, l'Anses avait été saisie, en 2015, par des ministères de tutelle d'une demande d'expertise pour éclairer les questionnements scientifiques relatifs à la cancérogénicité de cette substance. Pour y répondre, l'Agence avait alors constitué un GECU (groupe d'expertise collective en urgence), qui avait livré un premier rapport et un premier avis de l'Anses, datés du 9 février 2016.

Dans ce cadre, l'Anses s'était également auto-saisie, par le mandat donné au GECU en 2015, de questions complémentaires sur la génotoxicité des produits formulés à base de glyphosate, traitées dans un second temps après la question de la cancérogénicité du glyphosate.

Compte tenu de l'émergence à l'échelle européenne d'autres initiatives scientifiques, décrites ci-après et en rapport avec ce même questionnement, cette seconde partie de l'expertise n'avait pas été menée à son terme par l'Anses [au regard des procédures de l'Anses en matière d'expertise, fondées sur la norme NF X 50-110](#) : aucun rapport n'avait été validé, ni par le GECU, ni par le comité d'experts spécialisé (CES) « produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques »¹ auquel était rattaché ce GECU.

Du fait de questions posées récemment par plusieurs observateurs sur le devenir de ces travaux, l'Anses fait le choix de rendre publique la dernière version du document de travail élaboré par le GECU. Il s'agit d'une initiative de l'Anses, à des fins de transparence. En respect des procédures internes de l'Anses, la composition des

¹ Ces sujets relèvent aujourd'hui du CES « substances et produits phytopharmaceutiques, biocontrôle ».

collectifs d'experts est divulguée à l'issue de la validation des travaux. De ce fait, les noms des experts composant le GECU qui a concouru au document non finalisé sont occultés dans le document ci-joint.

La présente notice a été conçue pour accompagner la publication de ce document. Elle a pour objectif de remettre la production d'expertise de l'époque dans son contexte et d'éclairer l'itinéraire finalement retenu par l'Anses pour répondre aux questions du second volet de travaux engagés. La notice explicite notamment les évaluations et décisions qui ont eu lieu, de façon parallèle et concomitante aux travaux du GECU de 2015-2016, en France et à l'échelle européenne, et qui ont conduit à ne pas achever ces travaux.

Dans le cadre de ses procédures de management par la qualité, l'Anses a par ailleurs engagé une analyse de la manière dont cet arrêt en cours d'expertise est intervenu et dont il a été documenté, en vue de renforcer les modalités de gestion de ce type de situation. En tout état de cause, l'arrêt d'une expertise avant son terme doit être évité, les indications formulées par le comité de déontologie et de prévention des conflits d'intérêt de l'Agence indiquant qu'une expertise doit être menée à son terme² : « Le CDPCI conclut [...] au caractère inopportun de la possibilité d'arrêter un collectif d'experts, sauf consensus entre le collectif d'experts et l'agence ».

Rappel des travaux issus de la saisine de 2015 de l'Anses sur le glyphosate

Suite à des travaux divergents sur les propriétés cancérigènes du glyphosate, l'Anses a été saisie en avril 2015 par ses cinq ministères de tutelle pour évaluer l'origine de ces différences d'appréciation.

Pour répondre aux ministères dans les délais fixés, elle a constitué un GECU (groupe d'expertise collective en urgence), rattaché au comité d'experts spécialisé (CES) « produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques » - ce dernier étant en charge de la validation des travaux menés, conformément aux [procédures d'expertise](#) en vigueur à l'Anses.

Volet 1. Cancérogénicité potentielle de la substance active

A propos du classement du glyphosate en termes de cancérogénicité, il était demandé au GECU d'expliquer les divergences entre la monographie produite en 2015 par le

² Avis n°2018- 2 : Suspendre ou arrêter les travaux d'un collectif d'experts. Modalités et opportunité de l'introduction de nouvelles procédures

Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et les conclusions du rapport d'évaluation produit cette même année par l'Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) et l'État membre rapporteur (le BfR pour l'Allemagne), dans le cadre de la procédure de renouvellement de l'approbation européenne de la substance active glyphosate.

Pour ce faire, le GECU a comparé les référentiels utilisés pour l'évaluation à des critères d'interprétation des études épidémiologiques, expérimentales et mécanistiques, puis mené une analyse détaillée de leur application au jeu de données disponibles sur le glyphosate. Compte tenu du nombre très important d'études et de publications disponibles et des délais impartis, l'analyse du groupe de travail s'est appuyée exclusivement sur les rapports de l'évaluation européenne et du CIRC, et non directement sur les rapports d'études qui intègrent les données brutes ou la littérature scientifique publiée à l'époque.

Sur base de ces travaux, l'Anses avait conclu, dans un avis publié en février 2016, à un niveau de preuve de cancérogénicité chez l'animal et l'Homme limité et ne permettant pas de proposer un classement du glyphosate en tant que cancérogène avéré ou présumé pour l'être humain, au sens du règlement CLP (règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage). Au vu du niveau de preuve limité, l'Agence avait formulé le souhait que ce classement soit revu par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA).

En 2017, dans le cadre de la procédure de renouvellement de l'approbation du glyphosate, l'ECHA avait écarté à son tour la classification du glyphosate comme cancérogène, sur base du dossier soumis par l'État membre rapporteur et des commentaires reçus lors des consultations publiques et de la revue par les pairs.

De nouveau interrogée sur le sujet lors du dernier renouvellement de l'approbation de la substance active sur la base d'un dossier d'évaluation actualisé, l'ECHA avait conclu que la position sur la classification du glyphosate devait être maintenue : le glyphosate a donc été réapprouvé en 2023 sans classification de cancérogénicité au regard du règlement CLP.

Volet 2. Génotoxicité potentielle des co-formulants associés au glyphosate dans les produits commerciaux

L'Anses annonçait en 2016 dans son avis qu'elle avait également demandé au GECU, dans le mandat donné à celui-ci en 2015, « *d'identifier, dans un deuxième temps, si les résultats des études de génotoxicité réalisées sur la préparation représentative du dossier européen du glyphosate et présentés dans les projets d'évaluation du BfR (étaient) suffisamment robustes compte tenu des protocoles utilisés, et si ces résultats*

devaient conduire à des études supplémentaires sur les formulants et/ou sur les préparations ».

La génotoxicité, qui se traduit par une altération de l'ADN, peut en effet être à l'origine de mécanismes de cancérogénicité.

Cette saisine, engagée à l'initiative de l'Agence (auto-saisine) et confiée au même GECU, ne portait pas sur la substance active mais sur plusieurs produits phytopharmaceutiques, à savoir la préparation représentative incluse dans le dossier de renouvellement de l'approbation de la substance active glyphosate ainsi que plusieurs produits de composition identifiée par l'Anses.

Le document non finalisé sur lequel porte cette présente notice correspond aux premiers éléments d'expertise produits dans le cadre de cette auto-saisine ; les principaux éléments en sont restitués ci-après, dans le volet 3 et les chapitres suivants.

Volet 3. Actions annoncées dans la conclusion de l'avis de février 2016

Dans la conclusion de son avis de février 2016, l'Agence prenait plus globalement acte de préoccupations relatives à la potentielle génotoxicité des co-formulants ajoutés à la substance active glyphosate dans les préparations commerciales.

L'Anses annonçait ainsi engager deux actions :

1. La réévaluation sans délai des formulations associant glyphosate et POE-tallowamine, en tenant compte d'une très récente évaluation de l'EFSA³ qui mentionnait des points de préoccupation relatifs à l'association de co-formulants avec la substance active glyphosate. Cette réévaluation a abouti en juin 2016 au retrait des autorisations de mise sur le marché en France de 132 produits à base de glyphosate contenant ce co-formulant.
2. La poursuite de ses travaux sur les co-formulants avec la mise en place d'un groupe de travail sur les risques liés aux co-formulants présents dans l'ensemble des préparations phytopharmaceutiques, avec une priorité donnée aux préparations à base de glyphosate. **Cette initiative a été menée à bien dans le cadre de travaux européens dont les enjeux convergeaient avec les problématiques nationales.**

³ Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine. EFSA Journal 2015;13(11):4303.

Point sur les travaux nationaux et européens qui ont permis en 2016 et 2017 de progresser sur l'évaluation du potentiel de génotoxicité des co-formulants

Les travaux engagés par le GECU début 2016 s'appuyaient sur des études de génotoxicité conduites sur différents produits contenant du glyphosate : d'une part un produit cité dans trois articles scientifiques, à savoir la préparation représentative du rapport européen pour l'évaluation du glyphosate de 2015, et d'autre part plusieurs autres préparations pour lesquelles des tests ont été fournis dans le rapport européen pour l'évaluation du glyphosate de 2015.

Parallèlement aux travaux du GECU, des questions similaires se posaient à l'échelle européenne, en relation avec l'établissement d'une liste de co-formulants ne pouvant pas entrer dans la composition des produits phytopharmaceutiques ; des actions étaient également engagées à cette échelle. Ces travaux ont abouti à des interdictions de co-formulants et à une forte évolution de la législation européenne, notamment dans la période 2016-2017. Ce chapitre en donne le détail.

Interdiction européenne de l'association glyphosate + POE-tallowamine

L'absence d'effet nocif pour la santé humaine est l'une des conditions requises pour l'autorisation de produits phytopharmaceutiques dans l'Union européenne (article 29 du règlement (CE) n°1107/2009). Or, ce point ne pouvait pas être confirmé pour les produits à base de glyphosate contenant de la POE-tallowamine, au regard d'une expertise de l'EFSA de 2015 relative à ce co-formulant spécifique².

Peu après la décision de l'Anses, préfigurée dans l'avis de février 2016, de retirer 132 autorisations de mise sur le marché pour des produits associant glyphosate et POE-tallowamine, la Commission européenne a imposé aux États membres que les produits phytopharmaceutiques contenant du glyphosate ne contiennent pas ce co-formulant⁴. **Les produits contenant du glyphosate et de la POE-tallowamine ont donc été retirés du marché sur l'ensemble du territoire européen à partir d'août 2016.**

Mise en place d'un groupe de travail européen sur les co-formulants des produits phytopharmaceutiques

En décembre 2015, suite aux questionnements soulevés par la POE-tallowamine, la Commission européenne a demandé à chaque État membre de lui transmettre avant le 15 janvier 2016 la liste de tous les produits autorisés contenant du glyphosate ainsi

⁴ Règlement d'exécution (UE) n° 2016/1313 du 01/08/16 modifiant le règlement d'exécution (UE) n° 540/2011.

que la liste de tous les co-formulants utilisés dans au moins un produit autorisé contenant du glyphosate.

Cette initiative a été prolongée en février 2016 par la mise en place par la Commission d'un groupe de travail avec les États membres pour identifier des critères et constituer la liste de co-formulants ne pouvant pas entrer dans la composition des produits phytopharmaceutiques en général⁵.

Ce groupe de travail européen avait pour mission de constituer une liste préliminaire de co-formulants à écarter et de proposer des modalités pour identifier des co-formulants inacceptables dans les produits phytopharmaceutiques. Les travaux, qui se sont terminés en octobre 2017, ont été utilisés comme éléments préparatoires au règlement (UE) 2021/383 du 3 mars 2021 modifiant l'annexe III du règlement (CE) n°1107/2009 fixant la liste de co-formulants ne pouvant pas entrer dans la composition des produits phytopharmaceutiques.

Compte tenu de la convergence d'objectifs et de la proximité des calendriers, les conclusions du groupe de travail européen mis en place en février 2016 venaient alimenter l'expertise du GECU. L'Anses avait donc pris des dispositions pour que le groupe d'experts soit informé des orientations européennes sur les informations à fournir pour évaluer la génotoxicité des produits contenant du glyphosate.

Par ailleurs, du fait de la création de ce groupe de travail européen, l'Anses n'a pas donné suite à son projet, formulé dans sa conclusion de l'avis de février 2016, de mettre en place un groupe de travail sur les co-formulants à l'échelle française.

***In fine*, à l'issue des travaux du groupe de travail européen et de l'établissement d'une liste de co-formulants interdits par l'UE dans la législation, les produits à base de glyphosate (ou d'autres substances actives) comprenant ces co-formulants ont été retirés du marché français par l'Anses en application des nouvelles dispositions réglementaires.**

Renforcement réglementaire de l'évaluation de la génotoxicité des produits à base de glyphosate

Le rapport d'évaluation de la substance active glyphosate remis en 2015 par l'Allemagne signalait l'existence d'études faisant état de résultats positifs sur la génotoxicité. Ces résultats positifs étaient principalement observés dans des systèmes d'essai ne suivant pas des lignes directrices validées mais il existait également quelques résultats positifs discordants inexplicables, dans des systèmes d'essais sur mammifères

⁵ Ces co-formulants sont inscrits à l'annexe III du règlement (CE) n° 1107/2009.

plus largement utilisés en accord avec les lignes directrices de l'OCDE. Les données suggéraient que ces effets étaient probablement dus à des effets cytotoxiques (par exemple, des surfactants susceptibles de conduire à une atteinte de l'intégrité des membranes cellulaires) plutôt qu'à une interaction avec l'ADN. Toutefois, le rapport d'évaluation recommandait la réalisation d'études de génotoxicité additionnelles conformes aux lignes directrices de l'OCDE pour le produit représentatif et, plus généralement, pour l'autorisation des produits phytopharmaceutiques à base de glyphosate.

Dans le document non finalisé faisant l'objet de la présente notice, les premiers constats et orientations formulés par le GECU sur la génotoxicité des produits s'avéraient similaires à ceux du rapport d'évaluation : certaines études de génotoxicité sur les produits présentant des résultats positifs, le potentiel génotoxique des produits devait être mieux pris en compte lors du réexamen ou de la première autorisation des produits phytopharmaceutiques contenant du glyphosate. Pour ce faire, des études spécifiques ont été considérées comme nécessaires pour évaluer le potentiel génotoxique des produits.

En juillet 2017, indépendamment des travaux du GECU, la Commission européenne avait ainsi proposé aux États membres une évaluation systématique de la génotoxicité des produits contenant du glyphosate. Cette exigence a été confirmée dans le rapport d'évaluation finalisé adopté par les États membres en décembre 2017 dans le cadre du renouvellement de l'approbation du glyphosate.

L'exigence réglementaire a donc rejoint les premières orientations des travaux du GECU : des tests de génotoxicité étaient désormais systématiquement exigés en France pour traiter les demandes d'AMM de produits contenant du glyphosate.

Pour mettre en œuvre cette exigence spécifique lors de l'évaluation des produits, l'Anses s'est appuyée sur les recommandations méthodologiques de l'EFSA figurant dans un avis scientifique sur les stratégies de test de génotoxicité. Dès lors, pour le réexamen des produits après l'approbation de 2017, le potentiel génotoxique des produits à base de glyphosate a donc été documenté et évalué. Cette évaluation s'appuie sur des données dédiées, fournies dans chaque dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché

Il est à noter que cette évaluation, pour mémoire réalisée au niveau zonal⁶, a pu conduire à refuser ou retirer l'AMM non pas en raison de l'identification d'un potentiel génotoxique mais du fait de l'absence d'information sur ce potentiel.

⁶ La France est classée, au titre du règlement (CE) n°1107/2009, dans la zone sud avec l'Italie, l'Espagne, la Grèce, etc. (voir annexe I du règlement). L'évaluation du produit se fait par un Etat membre rapporteur

Dispositions du nouveau règlement de 2023 et modalités de renouvellement

Faisant suite à la nouvelle réapprobation de la substance active glyphosate en 2023, les produits sur le marché vont être réexaminés en prenant en compte les évolutions introduites dans le cadre du réexamen de la substance ainsi que les nouvelles méthodologies en vigueur.

Une attention particulière sera portée aux co-formulants présents dans les produits phytopharmaceutiques contenant du glyphosate, en tenant compte des critères d'identification des co-formulants inacceptables énoncés dans le règlement d'exécution (UE) 2023/574.

L'évaluation s'appuiera sur les tests de génotoxicité antérieurement fournis. Il convient de noter qu'aucun effet génotoxique n'a été identifié dans les évaluations réalisées lors du réexamen des demandes d'AMM en France après la réapprobation du glyphosate en 2017.

Document non finalisé : les principaux éléments de constats et de discussion

Dans un souci de transparence, l'Anses fait le choix de rendre publics les travaux du GECU tels qu'ils ont été présentés au Comité d'experts spécialisés « produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques » auquel le GECU était rattaché, lors de sa réunion de septembre 2016.

En l'absence de délibération et de validation par le comité d'experts spécialisé, ces travaux n'ont pas le statut de rapport d'expertise finalisé endossable par l'Anses.

En ce qui concerne la génotoxicité potentielle des produits contenant du glyphosate, **les constats et recommandations du GECU et ceux du rapport de réévaluation de l'État membre rapporteur dans le cadre du renouvellement de l'approbation de 2017 s'avéraient similaires : des études spécifiques sur les produits étaient considérées nécessaires pour évaluer le potentiel génotoxique des produits.**

Plus précisément, dans les éléments annexés à la présente notice, le GECU ébauchait les recommandations suivantes :

- « Des études supplémentaires sur les formulants et sur les produits sont nécessaires pour statuer sur leur potentiel mutagène et génotoxique. Pour répondre aux exigences réglementaires d'une part et apporter des réponses

pour toute la zone. Ainsi certaines décisions prises en France s'appuient sur l'évaluation d'un autre Etat membre rapporteur zonal.

consolidées aux signaux/alertes notés dans la littérature d'autre part, des essais *in vitro* [test de mutation génique sur cultures de cellules de mammifères, par exemple le test de mutation génique au locus TK sur cellules L5178Y de lymphome de souris ou sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6, OCDE n° 490] et *in vivo* [test des Comètes chez le rongeur, qui pourrait être couplé au test du micronoyau sur moelle osseuse] seraient à mettre en œuvre⁷.

- D'une façon plus générale, dès lors que des signes d'alerte génotoxiques ou d'une autre nature seraient identifiés sur des produits ou leurs composants, des tests appropriés devraient être envisagés. Une telle option nécessite cependant de procéder d'abord à une analyse critique approfondie du spectre de données disponibles sur le profil toxicologique de chaque composant en vue de consolider, le cas échéant, les données requises par l'évaluation réglementaire des produits (toxicité aiguë par voie orale, dermale et inhalation, irritation cutanée et oculaire, sensibilisation). Cet exercice devrait donner lieu à la construction d'un arbre de décision, faisant apparaître des exigences basées sur la qualité et la validité des données disponibles sur des classes de « endpoints » [points critiques] potentiellement préoccupants, autres que ceux concernant les effets sur le court terme. »

Pour des raisons qui relevaient des méthodologies suivies et de l'interprétation des données, un expert du GECU avait émis un point de vue divergent basé d'une part sur trois articles de Guilherme et *al.* (portant sur un même produit dans les trois articles) comprenant de nombreux biais et d'autre part sur les produits contenant de la POE-tallowamine. Dès lors, au regard des résultats publiés dans la littérature et des études présentées dans le dossier européen, **l'expert ne soutenait pas tous les termes de la conclusion générale envisagée par le GECU.** En particulier, la proposition d'études supplémentaires sur les co-formulants, certes nécessaire, devait à son avis aller au-delà de tests réglementaires classiquement attendus.

En septembre 2016, lors de la présentation au CES de l'état d'avancement des travaux du GECU, correspondant au document annexé à cette notice, le CES avait rappelé que les alertes d'alors relatives à la génotoxicité ne portaient pas sur le produit représentatif⁸ du dossier européen de la substance active, sur lequel le travail du GECU

⁷ Les études de génotoxicité demandées et évaluées dans le cadre du réexamen des produits se sont appuyées sur les recommandations méthodologiques de l'EFSA (Avis scientifique sur les stratégies de test de génotoxicité), en cohérence avec ces éléments.

⁸ Produit proposé par les pétitionnaires soutenant l'approbation de la substance, dans le dossier de demande d'approbation de la substance, afin de vérifier qu'au moins un usage est possible dans un Etat membre, conformément à la législation.

portait notamment, mais sur un autre produit contenant de la POE-tallowamine. De plus, **le CES avait relevé que la conclusion de l'avis divergent rejoignait la conclusion générale du GECU : des tests de génotoxicité devaient être réalisés sur les produits contenant du glyphosate.**

Conclusion

Le groupe d'experts mobilisé sur la saisine sur les divergences d'appréciation de la cancérogénicité de la substance active glyphosate en 2015 avait engagé, à la demande de l'Anses, un travail complémentaire d'autosaisine sur l'évaluation de la génotoxicité associée aux co-formulants des produits à base de glyphosate. Ce groupe d'experts a produit un document non finalisé car non validé selon les procédures de l'Anses, et donc non publié.

Ces travaux, annoncés dans l'avis de février 2016, n'avaient pas abouti du fait de travaux initiés en parallèle dans d'autres cadres scientifiques et réglementaires. En effet, un groupe de travail constitué d'experts des États membres avait été mis en place par la Commission européenne afin d'émettre des propositions relatives aux co-formulants ne pouvant pas entrer dans la composition des produits phytopharmaceutiques. Ces travaux avaient conduit à fournir les bases du règlement (UE) 2021/383 actuellement applicable.

Par ailleurs, la réévaluation européenne du glyphosate, qui avait abouti à la réapprobation de la substance active en 2017 avait imposé l'examen du potentiel de génotoxicité dans le cadre de l'évaluation des produits formulés.

De ce fait, les AMM délivrées par l'Anses après 2017, actuellement en vigueur, se rapportent uniquement à des produits à base de glyphosate pour lesquels les données de génotoxicité correspondent aux requis européens et ne montrent pas de risque sur ce critère de génotoxicité. L'Agence a notamment retiré du marché, en décembre 2019, trente-six produits pour lesquels un manque de données ne permettait pas de finaliser l'évaluation du potentiel génotoxique.

Les constats et recommandations du GECU sur la génotoxicité des produits, s'ils n'ont pas donné lieu à une expertise finalisée, ont donc bien été portés par l'Anses lors du réexamen des produits à base de glyphosate. Les études de génotoxicité fournies dans les dossiers pour lesquels une autorisation a été délivrée ont permis de s'assurer de l'absence de potentiel génotoxique des produits.

Saisine sur les propositions de classement du glyphosate par le CIRC

Saisine glyphosate n° 2015-SA-0093

RAPPORT **d'expertise collective** **Rapport additionnel : Réponse à la deuxième** **question**

GECU_glyphosate

Rapport additionnel – **v10**

PROJET

Mots clés

Glyphosate, tallow amine, génotoxicité, mutagenèse, préparation représentative.

Rapport : 21/09/2016 • version : v10

Modèle ANSES/PR1/9/01-04 [version b]

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GRUPE DE TRAVAIL

Président

X

Membres

X

X

X

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux d'expertise, objets du présent rapport, ont été présentés au CES "Produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques" lors de la séance du 27 septembre 2016.

PROJET

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Expertise collective : synthèse de l'argumentaire	6
Sigles et abréviations	7
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	8
Contexte	8
Objet de la saisine	8
Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	9
Prévention des risques de conflits d'intérêts.....	10
2 Analyse des données de génotoxicité disponibles sur les différentes formulations du dossier européen.....	11
2.1 Génotoxicité et mutagenèse de la préparation représentative du glyphosate et des formulations de composition identifiée.....	11
2.1.1 Tests de génotoxicités réalisés sur la préparation représentative	11
2.1.2 Tests de génotoxicité réalisés sur la formulation ROUNDUP® ULTRA.....	12
2.1.2.1 Guilherme <i>et al.</i> (2012a).....	12
2.1.2.2 Guilherme <i>et al.</i> (2012b).....	13
2.1.2.3 Guilherme <i>et al.</i> (2014).....	14
2.1.2.4 Synthèse des 3 articles de Guilherme <i>et al.</i>	15
2.1.3 Tests de génotoxicité réalisés sur les autres formulations de compositions identifiées.....	16
2.1.4 Autres essais de détermination du potentiel génotoxique des formulations	21
2.1.5 Cas de la méta-analyse de De Castilhos Ghisi <i>et al.</i> (2016).....	23
2.1.6 Conclusion relative à la génotoxicité des formulations de glyphosate	23
2.2 Génotoxicité et mutagenèse du POEA	24
3 Études de génotoxicité supplémentaires à conduire sur les préparations à base de glyphosate et sur le POEA.....	26
3.1 Études supplémentaires de génotoxicité à conduire sur la préparation représentative à base de glyphosate.....	26
3.2 Études supplémentaires de génotoxicité à conduire sur le POEA.....	29
4 Conclusions	31
5 Bibliographie.....	32
5.1 Publications.....	32
5.2 Normes.....	35
5.3 Législation et réglementation.....	36

ANNEXES	37
Annexe 1 : Lettre de la saisine glyphosate 2015-SA-0093	38
Annexe 2 : Mandat du GECU.....	40
Annexe 3 : EFSA 2015b "Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine"	43
Annexe 4 : Analyse Critique de l'article de Guilherme <i>et al.</i> (2012a).....	44
Annexe 5 : Analyse Critique de l'article de Guilherme <i>et al.</i> (2012b)	49
Annexe 6 : Analyse Critique de l'article de Guilherme <i>et al.</i> (2014).....	56
Annexe 7 : Point de vue divergent exprimé par X	62
Annexe 8 : Tableau B.6.4-29 du RAR (2015) : Genetic toxicology studies of glyphosate and glyphosate formulations published on or after 2000.....	69

PROJET

Expertise collective : synthèse de l'argumentaire et conclusions

Aucune étude de génotoxicité n'est disponible sur la préparation représentative du RAR. Concernant les 4 différentes formulations du glyphosate de composition définie, les résultats du test d'Ames et du test du micronoyau *in vivo* ne permettent pas de garantir l'absence de potentiel mutagène et génotoxique étant donnée leur faible pertinence.

La diversité des formulations, de composition inconstamment définie, testées avec leur lot d'inconnues (pourcentage de glyphosate, composition exacte en particulier la présence ou non de co-formulant(s), leur teneur lorsqu'ils sont présents ...), la diversité des systèmes d'essai mis en jeu (*in vitro*, *in vivo*, systèmes mammifères et non-mammifères, tests standardisés ou non ...), les incertitudes expérimentales, les biais relatifs aux normes de qualité scientifique ..., ne permettent pas de conclure quant à la génotoxicité et la mutagenèse de ces formulations du glyphosate.

Concernant le POEA, les données disponibles ne permettent pas de conclure sur son éventuel potentiel génotoxique *in vivo*.

Des études supplémentaires sur les formulants et sur les préparations sont nécessaires afin de statuer sur leur potentiel mutagène et génotoxique. Pour répondre aux exigences réglementaires d'une part et apporter des réponses consolidées aux alertes notées dans la littérature d'autre part, des essais *in vitro* (test de mutation génique sur cultures de cellules de mammifères) et *in vivo* (test des Comètes chez le rongeur, qui pourrait être couplé au test du micronoyau sur moelle osseuse) seraient à mettre en œuvre.

D'une façon plus générale, dès lors que des signes d'alerte génotoxiques ou d'une autre nature seraient identifiés sur des formulations ou leurs composants, des tests appropriés devraient être envisagés. Une telle option nécessite cependant de procéder d'abord à une analyse critique approfondie du spectre de données disponibles sur le profil toxicologique de chaque composant en vue de consolider, le cas échéant, les données requises par l'évaluation réglementaire des formulations (toxicité aiguë par voie orale, dermale et inhalation, irritation cutanée et oculaire, sensibilisation). Cet exercice devrait donner lieu à la construction d'un arbre de décision, faisant apparaître des exigences basées sur la qualité et la validité des données disponibles sur des classes de "end-points", potentiellement préoccupants, autres que ceux concernant les effets sur le court terme.

Les discussions du GECU ayant mis en évidence un avis divergent, une conclusion alternative est présentée en Annexe 7.

Sigles et abréviations

BfR : Bundesinstitut für Risikobewertung / Federal Institute for Risk Assessment

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

CIRC (IARC) : Centre International de Recherche sur le Cancer

CLP : Classification, Labelling, Packaging

DEPR : Direction de l'Évaluation des Produits Réglementés

DGAI : Direction Générale de l'Alimentation

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DGPR : Direction Générale de la Prévention des Risques

DGS : Direction Générale de la Santé

DGT : Direction Générale du Travail

ECHA : European Chemicals Agency (Agence européenne des produits chimiques)

EFSA : European Food Safety Authority (Autorité Européenne pour la Sécurité des Aliments)

GECU : Groupe d'expertise collective d'urgence

IARC (CIRC) : International Agency for Research on Cancer

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques

POEA : amine de suif ou tallow amine polyéthoxylée, CAS n° 61791-26-2

RAR UE : European Union Risk Assessment Report

RMS : Rapporteur Member State

US-EPA : United States Environmental Protection Agency

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

Contexte

Le glyphosate est actuellement en cours de réévaluation dans le cadre de la procédure de renouvellement décennal d'approbation des substances actives phytopharmaceutiques au titre du Règlement (CE) n° 1107/2009. Cette nouvelle évaluation, coordonnée par l'EFSA a été confiée à l'Allemagne (Etat Membre Rapporteur) qui a mandaté le BfR pour rédiger le projet de rapport d'évaluation européen (RAR UE) soumis à tous les Etats Membres de l'UE. Cette expertise, qui inclut une compilation des données toxicologiques réglementaires actualisées et une revue de la littérature ouverte ne propose pas de classement du glyphosate en termes de cancérogénicité ou mutagenèse.

Or le 10 mars 2015, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) placé auprès de l'organisation mondiale de la santé a annoncé que le glyphosate devait désormais être classé cancérogène 2A, soit « cancérogène probable pour l'homme », considérant un faisceau de preuves de cancérogenèse du glyphosate limité au plan épidémiologique, mais suffisant au plan expérimental et au plan des mécanismes d'induction tumorale (génotoxicité, stress oxydant ...). La monographie qui a conduit le CIRC à proposer cette classification a été publiée¹.

Ces évaluations ont conduit les ministères à interroger l'Anses sur les dangers du glyphosate pour la santé humaine.

Objet de la saisine

L'Anses a été saisie (Annexe 1) le 08 avril 2015 par la DGCCRF, la DGPR, la DGS, la DGT et la DGAL afin d'analyser les éléments présentés dans la monographie du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) sur le glyphosate et dans les rapports d'expertise de l'Etat membre rapporteur et indiquer s'ils sont de nature à soutenir une proposition de modification de la classification du glyphosate selon les règles définies dans le Règlement (CE) N°1272/2008 (CLP) pour ce qui concerne les propriétés cancérigènes.

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine à un groupe d'expertise collective d'urgence (GECU).

Dans un deuxième temps, il a été demandé au GECU d'identifier si les résultats des études² de génotoxicité réalisées sur la préparation représentative³ du dossier européen du glyphosate et présentés dans les projets d'évaluation du BfR sont suffisamment robustes compte tenu des

¹ CIRC/IARC. 2015. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides: Diazinon, Glyphosate, Malathion, Parathion, and Tetrachlorvinphos. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volume 112. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

² Publiées dans la littérature.

³ Le règlement (CE) n°1107/2009 précise que le dossier d'approbation ou de ré-approbation d'une substance active doit comporter les informations relatives à une ou plusieurs utilisations représentatives, sur une culture très répandue dans chaque zone, d'au moins une préparation phytopharmaceutique contenant cette substance active ; cette préparation est dite préparation représentative.

protocoles utilisés, et si ces résultats doivent conduire à des études supplémentaires sur les formulants et/ou sur les préparations.

La saisine et le mandat du GECU sont présentés en Annexes 1 et 2.

Au cours de la réunion du 23 février 2016, les membres du GECU ont souhaité un éclaircissement quant aux termes de la deuxième question posée afin de définir plus précisément le champ d'investigation de cette expertise et ses limites. Etant donné le très court délai de réponse imparti, il a été acté qu'il n'était pas possible de faire cet exercice sur l'ensemble des co-formulants utilisés et utilisables pour l'ensemble des formulations à base de glyphosate⁴, à savoir, statuer quant à leur activité génotoxique et la nécessité d'études complémentaires de génotoxicité voire mécanistiques. L'Anses va confier cette mission à un Groupe de Travail spécifique. Ainsi, le présent rapport s'intéresse spécifiquement aux données de génotoxicité disponibles de la préparation représentative du dossier européen du glyphosate et/ou des préparations de composition identifiée et, à la demande de l'Anses, une attention particulière est également portée sur le POEA (tallow amine polyéthoxylée, CAS n° 61791-26-2) même si ce dernier n'est pas un formulant de la préparation représentative du glyphosate.

Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

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) »

Le GECU est constitué de quatre experts ayant des compétences dans les domaines de la classification des substances, mais également de la cancérogenèse, de la mutagenèse et de l'épidémiologie (voir présentation en début de rapport).

La coordination du GECU est assurée par la DEPR ; toutes les réunions ont fait l'objet d'un enregistrement audio.

Le calendrier de l'expertise est le suivant :

- Pour la première question

« Identifier si les éléments présentés dans les évaluations du CIRC et ceux présentés dans les évaluations du BfR dans le cadre de l'évaluation européenne sont de nature à soutenir une proposition de modification de la classification du glyphosate selon les règles définies dans le Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP) pour ce qui concerne les propriétés cancérogènes. »

X a présidé les travaux du GECU pour cette première question.

Les 2 réunions du groupe (02 et 18 novembre 2015) ont abouti à la rédaction d'un rapport d'expertise, qui a été présenté aux CES «Substances chimiques visées par les règlements REACH et CLP» et «Produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques», respectivement les 15 et 16 décembre 2015, et validé le 04 février 2016.

Sur la base de ce rapport d'expertise, l'Anses a rendu son avis le 09 février 2016.

- Pour la deuxième question

« Identifier si les résultats des études de génotoxicité réalisées sur la préparation représentative du dossier européen et présentés dans les évaluations du BfR sont suffisamment robustes compte tenu des protocoles utilisés, et si ces résultats doivent conduire à des études supplémentaires sur les formulants et/ou sur les préparations à base de glyphosate.»

⁴ Les compositions des formulations à base de glyphosate ne sont par ailleurs pas toutes disponibles.

X a présidé les travaux du GECU pour cette deuxième question.

- . Réunions du GECU : 24 février 2016 et 18 mars 2016,
- . Présentation du rapport au CES «Produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques» : 27 septembre 2016,
- . Finalisation du rapport d'expertise : xx septembre 2016.

La réponse à la deuxième question fait l'objet de ce rapport additionnel.

Par ailleurs, les discussions du GECU sur cette deuxième question ont mis en évidence la position divergente de X, liée aux critères d'évaluation des publications ; cette position divergente s'est maintenue à la fin des travaux et a fait l'objet d'une conclusion alternative reportée en Annexe 7.

Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'analyse par l'Anses des liens d'intérêts déclarés par les experts a été faite 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.

Sur la base de ces analyses, aucun lien ou conflit d'intérêt n'a été mis en évidence.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

2 Analyse des données de génotoxicité disponibles sur les différentes formulations du dossier européen

Relativement peu de documents sont disponibles. Le GECU dispose des documents suivants mis à disposition par l'Agence :

- Glyphosate Renewal Assessment Report. Volume 3 - Annex B.6 'Toxicology and Metabolism'. 29 January 2015 (Revised 31 march 2015). RMS Germany, Co-RMS Slovakia,
- CIRC/IARC. 2015. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides: Diazinon, Glyphosate, Malathion, Parathion, and Tetrachlorvinphos. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volume 112. Lyon: International Agency for Research on Cancer,
- Glyphosate Renewal Assessment Report. Volume 3 - Addendum 1 to RAR, Assessment of IARC monographs, vol 112 (2015): glyphosate. RMS Germany, 31 Aug 2015,
- EFSA 2015a. "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate." EFSA Journal 13 (11):4302. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302,
- EFSA 2015b. "Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine." EFSA Journal 13 (11):4303. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4303. (Fourni en Annexe 3),
- Règlement (CE) N° 1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008, relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N) 1907/2006, JOUE L 353/1 du 31 décembre 2008,
- Quelques publications relatives à la génotoxicité, au « stress oxydatif » induit par les formulations.

2.1 Génotoxicité et mutagenèse de la préparation représentative du glyphosate et des formulations de composition identifiée

2.1.1 Tests de génotoxicités réalisés sur la préparation représentative

La préparation représentative, MON 52276⁵ contient 486 g/L de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (soit 360 g/L de glyphosate équivalent acide) ; cette formulation ne contient pas de POEA. Aucun test réglementaire de génotoxicité n'est disponible pour cette formulation⁶.

⁵ Il s'agit de la préparation, présentée dans le RAR, permettant de procéder à l'évaluation du risque.

⁶ Selon le règlement (CE) n°1107/2009 en vigueur, aucun test de génotoxicité n'est requis pour les formulations.

2.1.2 Tests de génotoxicité réalisés sur la formulation ROUNDUP® ULTRA

Des essais de génotoxicité (test des Comètes en conditions alcalines) ont été réalisés avec la formulation ROUNDUP® ULTRA en exposant des poissons à cette formulation (Guilherme, 2012a, 2012b et 2014). L'analyse critique spécifique de ces 3 publications est résumée ci-dessous et détaillée dans les Annexes 4, 5, et 6. La formulation ROUNDUP® ULTRA contient 486 g/L de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (soit 360 g/L de glyphosate équivalent acide) et 148 g/L d'amine polyéthoxylée (surfactant).

2.1.2.1 Guilherme *et al.* (2012a)⁷

L'activité génotoxique d'une préparation à base de glyphosate (ROUNDUP® ULTRA), de la substance active (glyphosate) et du POEA a été étudiée chez le poisson (*Anguilla anguilla*). Le test des Comètes a ainsi été réalisé sur les cellules sanguines d'anguilles juvéniles, exposées pendant 1 ou 3 jours, aux concentrations de 58 et 116 µg/L d'une préparation commerciale de glyphosate, de 17,9 et 35,7 µg/L de glyphosate seul ou de 9,3 et 18,6 µg/L de POEA. En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (FPG ou EndoIII). Le niveau de fragmentation de l'ADN a été estimé visuellement puis les noyaux ont été classés dans 5 catégories de Comètes, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment l'intégrité de l'ADN dans la queue) et un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator) a été calculé (cf. Annexe 4 pour détails).

Après une période de 24 heures de traitement, des augmentations statistiquement significatives du GDI ont été observées pour tous les types de traitement, comparativement au groupe témoin négatif (excepté à la plus faible concentration de ROUNDUP® ULTRA). Après 3 jours d'exposition, des augmentations statistiquement significatives du GDI ont également été observées. Aucune différence de relation dose/effet n'a été observée quelle que soit la durée de traitement. Les résultats correspondant à la fragmentation supplémentaire de l'ADN, observée après traitement par les enzymes spécifiques, ont révélé que le risque génotoxique associé à l'oxydation de l'ADN n'a eu lieu qu'après 1 jour de traitement, à la concentration la plus faible de ROUNDUP® ULTRA.

L'étude de Guilherme *et al.* (2012a) est entachée d'incertitudes et biais méthodologiques. En outre, aucune indication du niveau de pureté du lot de glyphosate et du POEA n'est fournie. De plus, l'espèce animale utilisée n'est pas d'élevage mais sauvage et on ne peut pas exclure des variabilités interindividuelles. Concernant l'analyse, aucune indication concernant le codage des lames n'est fournie.

L'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN a été réalisée par catégorisation des noyaux en fonction de l'intensité et la longueur de la queue avant de calculer la valeur du GDI. Alors que celui-ci n'intègre pas les cellules non endommagées, il attribue le facteur maximal aux cellules fantômes, alors qu'elles auraient dû être exclues du comptage et comptabilisées séparément. Cette méthode surestime probablement le niveau réel du niveau de fragmentation de l'ADN et prend potentiellement en compte des phénomènes non génotoxiques. Il convient de rappeler que seul le pourcentage d'ADN de queue (intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats selon la ligne directrice de l'OCDE n°489.

Par ailleurs, aucune donnée historique, établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce, n'est présentée, ce qui rend impossible

⁷ Guilherme, S., M. A. Santos, C. Barroso, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2012a. "Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms." *Ecotoxicology* 21 (5):1381-90. doi: 10.1007/s10646-012-0892-5.

l'estimation de la compétence mais aussi l'évaluation de la significativité biologique des effets observés.

Les résultats du test des Comètes *in vivo* ainsi réalisé sur les cellules sanguines d'anguilles juvéniles, exposées pendant 1 ou 3 jours à une préparation à base de glyphosate, ou à la substance active seule ou au POEA, montrent des effets statistiquement significatifs. Les auteurs soulignent qu'après 1 jour d'exposition, la formulation ROUNDUP® ULTRA s'est révélée moins génotoxique que le glyphosate ou le POEA testés isolément et supposent une interaction antagoniste entre le glyphosate et le POEA. Cette conclusion reste totalement hypothétique et peu convaincante, parce que d'une part, de nombreux autres types d'interactions peuvent avoir lieu dans un mélange et, que d'autre part, cette observation n'a pas été faite après 3 jours de traitement alors qu'aucune tentative d'explication n'ait été avancée. L'attribution des effets à des phénomènes de nature oxydante est totalement spéculative car aucune recherche spécifique des lésions oxydées de l'ADN n'a été réalisée.

Dans tous les cas, ces résultats significatifs peuvent ne pas être dus exclusivement à la génotoxicité, la toxicité pour les tissus cibles pouvant également se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN. Or, aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été réalisée.

L'étude de Guilherme *et al.* (2012a) ne peut pas être utilisée pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, du glyphosate ni-même du POEA. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques, de l'utilisation d'anguilles juvéniles sauvages, l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant probablement le niveau de fragmentation de l'ADN. Enfin, sans donnée de distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologiques des éventuels effets.

2.1.2.2 Guilherme *et al.* (2012b)⁸

Cette publication a utilisé les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans l'article résumé ci-dessus et étudie l'éventuelle implication du « stress oxydatif » comme mécanisme d'action génotoxique. Dans cette étude, la procédure standard du test des Comètes a été appliquée aux cellules de branchies et de foie. En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé exclusivement sur les cellules hépatiques avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (FPG) afin d'optimiser la mise en évidence entre autres lésions, des dommages oxydatifs de l'ADN. De plus, les activités superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion-S-transférase (GST), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR) ainsi que la teneur totale en glutathion (GSht) ont été déterminées dans les deux organes.

Des augmentations statistiquement significatives des valeurs de GDI des cellules de branchies ont été observées dans les groupes traités avec la formulation ROUNDUP® ULTRA par rapport aux témoins respectifs aussi bien après une exposition d'1 jour qu'après 3 jours. Vis-à-vis du foie, un effet significatif a été noté dans les 2 groupes traités après une exposition de 1 jour et uniquement à la dose maximale après 3 jours de traitement. En présence de FPG (foie), des différences significatives ont été retrouvées exclusivement après l'exposition de 3 jours pour le groupe traité avec la dose maximale. Concernant la mesure des activités anti-oxydantes au niveau des cellules de branchies, une augmentation significative a été retrouvée uniquement pour l'activité CAT dans le groupe dose maximale de la formulation ROUNDUP® ULTRA après une exposition de 3 jours.

⁸ Guilherme, S., I. Gaivao, M. A. Santos, and M. Pacheco. 2012b. "DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress." *Mutation Research* 743 (1-2):1-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.017.

Vis-à-vis du foie, aucune modification n'a été observée dans les réponses anti-oxydantes à l'exception d'une diminution significative de l'activité de la SOD dans le groupe dose minimale, après l'exposition de 3 jours.

Cette étude est entachée des mêmes nombreuses incertitudes et biais méthodologiques que l'étude précédente (Guilherme *et al.*, 2012a) : aucune indication du niveau de pureté du lot de glyphosate, utilisation d'une espèce animale sauvage, estimation du niveau de fragmentation de l'ADN par catégorisation des noyaux et calcul d'un indicateur peu pertinent, pas d'estimation des niveaux de cytotoxicité, absence de donnée historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce....

Si des effets statistiquement significatifs ont été notés vis-à-vis des cellules de branchies et de foie, ces résultats pourraient ne pas être dus à une génotoxicité mais à des phénomènes confondants de toxicité qui n'ont pas été recherchés, alors qu'aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été réalisée. De plus, aucune augmentation significative n'est observée au cours du test des Comètes modifié (en présence de FPG), signifiant qu'aucune oxydation de l'ADN n'a lieu après une période de 24 h de traitement. A l'inverse, après 3 jours d'exposition, des augmentations des scores de GDI ont été obtenues en présence de FPG dans le groupe dose maximale. Or, cet effet n'est pas accompagné d'une activation des systèmes antioxydants mesurés. En l'absence de variation significative de systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, et avec un effet significatif exclusivement après 3 jours d'exposition dans le groupe dose forte dans le test des Comètes modifié, l'oxydation n'apparaît pas être un mécanisme d'action plausible.

L'étude de Guilherme *et al.* (2012b) ne peut être utilisée ni pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, ni pour élucider un hypothétique mécanisme d'action génotoxique. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques, de l'utilisation d'anguilles juvéniles sauvages, l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant probablement le taux de fragmentation de l'ADN. Sans donnée de distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologiques des éventuels effets. Enfin, avec un effet significatif dans des conditions expérimentales très limitées et sans modification claire des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques mesurés, la démonstration d'un potentiel effet génotoxique via un mécanisme d'action oxydant n'est pas faite.

2.1.2.3 Guilherme *et al.* (2014)⁹

Cette publication a utilisé les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans les 2 articles résumés ci-dessus et étudié, au-delà de l'oxydation, l'éventuelle « rémanence » des effets observés. Dans cette étude, la procédure standard du test des Comètes a été appliquée aux cellules sanguines. En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (FPG ou EndoIII) afin d'optimiser la mise en évidence entre autres lésions, des dommages oxydatifs de l'ADN.

Des augmentations statistiquement significatives des valeurs de GDI des cellules sanguines ont été observées dans les groupes traités par rapport au groupe témoin. Après recouvrement, les groupes correspondant aux périodes post-exposition de 1 ou 7 jours ont montré des différences significatives par rapport à leur contrôle respectif, alors qu'après 14 jours, des diminutions

⁹ Guilherme S., M. A. Santos, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2014. "Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?" *Aquatic Toxicology* 155:213-221. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.06.007.

significatives des valeurs de GDI ont été notées par rapport aux 2 autres groupes de 1 et 7 jours post-exposition.

Concernant le test des Comètes modifié (+ EndoIII), des augmentations des valeurs de GDI ont été observées après 3 jours d'exposition à la formulation ROUNDUP® ULTRA. Après des périodes de recouvrement, le groupe traité + 1 jour post-exposition a montré des valeurs de GDI les plus élevées par rapport aux groupes 7 et 14 jours après exposition.

Comme les 2 études précédentes (Guilherme *et al.*, 2012a, b), cette étude est entachée des mêmes nombreuses incertitudes et biais méthodologiques (aucune indication du niveau de pureté du lot de glyphosate, utilisation d'une espèce animale sauvage, une seule dose testée, estimation du niveau de fragmentation de l'ADN par catégorisation des noyaux et calcul d'un indicateur peu pertinent, pas d'estimation des niveaux de cytotoxicité, absence de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce...).

En termes d'interprétation, les valeurs de GDI avec enzymes juste après traitement sont équivalentes voire légèrement inférieures aux essais sans enzyme. Pour les essais avec FPG ou EndoIII, après recouvrement les valeurs obtenues à 7 et 14 jours sont du même niveau que celui du contrôle négatif juste après traitement (et même celui de la version standard), ce qui démontre que ces valeurs sont dans des gammes de valeurs négatives. Ces « effets » ne peuvent donc pas être considérés comme biologiquement significatifs.

Le rationnel de cette étude n'est pas correctement étayé. En effet, les auteurs ont recherché des lésions primaires de l'ADN jusqu'à 14 jours post-exposition alors qu'il ne peut pas y avoir d'accumulation de lésions primaires de l'ADN. De plus, le glyphosate a un faible potentiel de bioaccumulation (Efsa Journal, 2015).

Globalement, sur la base de ces données, on ne peut pas conclure à un effet pro-oxydant immédiat ou « retard » ce qui apparaît cohérent avec l'étude précédente (2012b) qui ne démontrait pas de réelle variation significative des systèmes antioxydant investigués (cf. paragraphe 2.1.1.2).

L'étude de Guilherme *et al.* (2014) ne peut être utilisée ni pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, ni pour élucider un possible mécanisme d'action génotoxique. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques dans des conditions expérimentales très limitées (une seule dose), l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant le taux de fragmentation de l'ADN en intégrant les cellules fantômes. Sans données de distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologique des éventuels effets.

2.1.2.4 Synthèse des 3 articles de Guilherme *et al.*

Les 3 études de Guilherme *et al.* (2012a, 2012b et 2014) utilisent le même système d'essai et des conditions expérimentales similaires. Ces études révèlent les mêmes incertitudes et biais méthodologiques :

- Aucune indication des niveaux de pureté des éléments d'essai,
- Aucune indication de la stabilité des éléments d'essai (milieux de traitement renouvelés toutes les 24 heures),
- Utilisation d'une espèce animale sauvage,
- Nombre de doses insuffisant (une seule dose testée : article 2014),
- Estimation visuelle du niveau de fragmentation de l'ADN par catégorisation des noyaux et calcul d'un indicateur peu pertinent,
- Pas d'estimation des niveaux de cytotoxicité empêchant de garantir l'absence d'interférence de ce type de phénomènes,

- Absence de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce, empêchant de déterminer la significativité biologique de certaines observations,
- Interprétation basée exclusivement sur des tests statistiques...

Sur la base de ces essais, les résultats obtenus ne permettent ni de conclure quant au potentiel génotoxique de la formulation ROUNDUP® ULTRA, du glyphosate ou du POEA, ni d'élucider un mécanisme d'action de type pro-oxydant.

Avec de très nombreux biais méthodologiques, une interprétation basée uniquement sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant probablement le niveau de fragmentation de l'ADN, en absence d'estimation de la significativité biologique des éventuels effets..., les études de Guilherme *et al.* (2012a, 2012b et 2014) ne peuvent en aucun cas être utilisées pour caractériser le danger génotoxique de la formulation ROUNDUP® ULTRA, du glyphosate ni-même du POEA.

2.1.3 Tests de génotoxicité réalisés sur les autres formulations de compositions identifiées

Selon le RAR, un total de 8 études de mutagenèse utilisant 4 formulations différentes de glyphosate (RODEO®, MON 2139, MON 14445 et GLIFOS®) a été mis à la disposition du Rapporteur par les sociétés Monsanto et Cheminova. Pour chacune de ces formulations, un test d'Ames et un test du micronoyau sur moelle osseuse de souris ont été soumis. Les études ont été réalisées en conformité avec les lignes directrices de l'OCDE (n° 471 pour le test de mutation génique sur bactéries et n° 474 pour le test du micronucleus sur moelle osseuse de rongeur) dans des conditions BPL ou assimilées. Ces études sont toutes scientifiquement valables et peuvent être utilisées pour l'évaluation des risques, bien que les études avec la formulation GLIFOS® aient été considérées comme ayant une valeur limitée. Les deux systèmes d'essai mis en jeu sont largement utilisés et acceptés pour les produits chimiques et des résultats issus des mêmes tests pour le glyphosate sont disponibles ce qui peut permettre une comparaison directe entre la substance active et certaines de ses formulations.

La composition des formulations testées, fournies dans le RAR, est indiquée ci-dessous :

- RODEO® est une formulation contenant 54% de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (IPA), de l'eau, mais pas de tensio-actifs. Les études ont été réalisées et les données fournies pour permettre l'évaluation de la génotoxicité du sel d'IPA (dans la plupart des études de mutagenèse, le matériel d'essai étant du glyphosate acide).
NB : Les études sur RODEO® ont été présentées dans le cadre du dossier conjoint de Monsanto et Cheminova puisque cette formulation est considérée comme standard du glyphosate sous forme de sel d'IPA, sans autre substance chimique.
- La formulation ROUNDUP® (MON 2139) est composée de 31% de glyphosate équivalent acide, de **tallowamine** (MON 0818, qui contient environ 70% de tallowamine, n° CAS 61791-26-2) et d'eau. La teneur en MON 0818 n'est pas précisée.
- La formulation DIRECT® (MON 14445) contient 72% de glyphosate équivalent acide, formulé sous forme de sel d'ammonium et également avec la tallowamine comme agent tensio-actif (Ethomeen T25, de teneur en **tallowamine** C20-C25 non précisée). D'après la base de données des rapporteurs du RAR, c'est le seul sel d'ammonium de glyphosate testé pour l'évaluation de la mutagenèse.
- La formulation GLIFOS® (dénomination utilisée au Brésil, correspondant au GLYPHOS® en Europe) est une formulation de glyphosate synthétisée par Cheminova. Elle contient du sel d'IPA à une concentration de 360 g/L. Selon les fichiers de données

d'enregistrement national allemand, le produit est bien composé de sel d'IPA, d'eau mais également de Berol 907, apportant 70% de **tallowamine**.

Les conditions et les résultats des essais sont résumés dans les Tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Tableau 1 : Synthèse des études de génotoxicité sur des formulations d'herbicides contenant du glyphosate – Test d'Ames (*d'après RAR, 2015*)

Study type	Test material	Test system	Dose range/ Test conditions	Result	Reference
Ames test	RODEO® (containing IPA salt and water only)	S. typhimurium strains TA 98, 100, 1535, 1537	50 – 5000 µg/plate; +/- S9	Negative; no signs of cytotoxicity	Kier <i>et al.</i> , 1992 TOX9552373
Ames test	MON 2139 (ROUNDUP® containing IPA salt, a tallowamine surfactant and water)	S. typhimurium strains TA 98, 100, 1535, 1537	5 - 500 µg/plate (- S9) / 15 - 1500 µg/plate (+S9)	Negative; cytotoxic at the maximum dose levels, occasionally also at lower concentrations	Kier <i>et al.</i> , 1992 TOX1999-239
Ames test	MON 14445t (DIRECT®, containing ammonium salt, a tallowamine surfactant and water)	S. typhimurium strains TA 98, 100, 1535, 1537	5 - 500 µg/plate (- S9) / 15 – 1500 µg/plate (+S9)	Negative; cytotoxic at the maximum dose levels, occasionally also at lower concentrations	Kier <i>et al.</i> , 1992 TOX1999-320
Ames test	GLIFOS® formulation (IPA salt, Berol 907 and water)	S. typhimurium strains TA 97a, 98, 100 and 1535	1, 10, 100, 1000, 5000 µg/plate; +/- S9	Negative; cytotoxic at the two upper concentrations	Vargas, 1996* TOX1999-884

* *Etude ayant une valeur limitée pour l'évaluation des risques*
Dans tous les essais, le solvant est l'eau distillée.

Tableau 2 : Synthèse des études de génotoxicité sur des formulations d'herbicides contenant du glyphosate – Test du micronucleus *in vivo* sur moelle osseuse de rongeur (*d'après RAR, 2015*)

Study type	Test material	Test system	Dose range/ Test conditions	Result	Reference
Micronucleus test	RODEO® formulation in 0.9% saline	CD-1 mice (m/f), bone marrow, single i.p. administration	0-850-1700-3400 mg/kg bw; sampling after 24, 48 and 72h	Negative for chromosome aberrations; overt toxicity (clinical signs, bw ⁻ , death) at the upper dosages	TOX9552376 1992

Study type	Test material	Test system	Dose range/ Test conditions	Result	Reference
Micronucleus test	ROUNDUP® formulation in 0.9% saline	CD-1 mice (m/f), bone marrow, single i.p. administration	0-140-280-555 mg/kg bw; sampling after 24, 48 and 72h	Negative (no chromosome aberrations); toxic to mice at 555 mg/kg bw with some deaths occurring, cytotoxic to the bone marrow (PCE/NCE ratio at 48-h sampling) at this top dose level	TOX1999-242 1992
Micronucleus test	DIRECT® formulation in 0.9% saline	CD-1 mice (m/f), bone marrow, single i.p. administration	0-91-183-365 mg/kg bw; sampling after 24, 48 and 72h	Negative for chromosome aberrations; signs of general toxicity at the top and, although less pronounced, mid dose level	TOX1999-322 1992
Micronucleus test	GLIFOS® formulation in distilled water	Swiss albino mice (m/f), two i.p. injections with 24-h interval	0-68-137-206 mg/kg bw; sampling at 24h after the second dose	Negative. No indications of cytotoxic effects to the bone marrow. No information regarding general toxicity in the main study.	TOX1999-253 1996*

m/f : souris mâles et femelles

* Etude ayant une valeur limitée pour l'évaluation des risques

D'après les commentaires et conclusion du RAR, les 4 formulations testées, RODEO®, ROUNDUP® (MON 2139), DIRECT® et GLIFOS®, contenant du glyphosate sous forme de sel d'IPA ou d'ammonium, seul ou en combinaison avec différents agents tensio-actifs, n'induisent pas de mutations géniques vis-à-vis de diverses souches de *Salmonella typhimurium* et ne présentent de potentiel génotoxique *in vivo* sur moelle osseuse.

Le RAR note que, lorsque les résultats obtenus dans les mêmes systèmes d'essai (test d'Ames ou test du micronucleus) pour la substance active et pour les formulations sont comparés, il apparaît que les plus fortes concentrations (ou doses) analysables étaient généralement plus faibles avec les formulations, à l'exception des essais sur RODEO®. Ceci est apparemment lié à un niveau de cytotoxicité (ou de toxicité pour les essais *in vivo*) plus élevé du fait que les formulations contiennent des ingrédients autres que le sel de glyphosate et l'eau.

En effet, concernant le test d'Ames, des concentrations beaucoup plus élevées de substance active ont pu être testées sans induire de cytotoxicité significative (jusqu'à des concentrations de 10 000 µg/boîte ; Chan et Mahler, 1992). Avec les formulations décrites ci-dessus, seule la formulation RODEO® qui est constituée de glyphosate sous forme de sel d'IPA et d'eau a été

testée à des concentrations élevées. En revanche, la cytotoxicité très importante obtenue pour les 3 autres formulations a empêché d'évaluer correctement leur potentiel mutagène (avec des niveaux de doses exploitables inférieurs à 250 µg/boîte). Par conséquent, on peut supposer que la cytotoxicité est bien due aux tensio-actifs présents, mais pas au glyphosate lui-même ou à ses sels. De plus, les effets cytotoxiques sont apparus plus prononcés avec ROUNDUP®, DIRECT® et GLIFOS® qu'avec RODEO® suggérant une activité cytotoxique particulièrement élevée de la tallow amine.

Pour les essais *in vivo*, aucune activité génotoxique n'a été observée dans les tests du micronucleus sur moelle osseuse suite à une exposition par voie IP d'après les 4 études relevées dans le RAR. En revanche, la toxicité des formulations contenant des agents tensio-actifs s'est révélée beaucoup plus élevée que celle de la substance active seule, à l'exception de RODEO® (glyphosate sous forme de sel d'IPA, sans agent tensio-actif, administré par voie intrapéritonéale à des souris à la dose de 850 mg/kg de poids corporel sans provoquer de toxicité). Comparativement, les études micronoyau sur le glyphosate seul ont été réalisées aux doses très élevées de 4000 ou 5000 mg/kg de poids corporel chez la souris. Cependant, toutes ces études sur la substance active ont été réalisées en utilisant la voie orale, le seul test de micronucleus utilisant la voie IP ayant été réalisé chez le rat à la dose maximale de 1000 mg/kg pc de glyphosate.

Commentaires du GECU :

○ Concernant la nature des éléments d'essai :

Les résultats disponibles ont été générés sur des formulations différentes, *i.e.* RODEO®, ROUNDUP® (MON 2139), DIRECT® et GLIFOS®, qui contiennent du glyphosate sous forme de sel d'IPA ou d'ammonium, seul ou en combinaison avec différents agents tensio-actifs.

Seule la formulation RODEO® ne contient pas d'agent tensio-actif, les 3 autres formulations contenant toutes des agents tensio-actifs dont la tallowamine, à des teneurs non connues. La présence de tallowamine a pour conséquence directe d'induire des effets (cyto)toxiques bien plus prononcés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui peut soulever la question de la pertinence des résultats de génotoxicité obtenus avec ces formulations.

○ Concernant les systèmes d'essais

Deux méthodologies ont été mises en œuvre avec les formulations de composition identifiée du glyphosate : Le test d'Ames (OCDE N° 471), qui est un test de mutation génique réalisé sur bactéries, et le test du micronucleus sur moelle osseuse de rongeurs (OCDE N°474) qui est un test d'aberrations chromosomiques *in vivo*.

Si les résultats des tests d'Ames s'avèrent tous clairement négatifs, ils ont permis de constater que les concentrations testées de glyphosate seul étaient beaucoup plus élevées que celles utilisées pour les formulations ROUNDUP®, DIRECT® et GLIFOS®. Seule la formulation RODEO® a été testée à des concentrations plus élevées que les autres formulations, suggérant une activité cytotoxique particulièrement élevée de la tallowamine, ce qui est en fait attendu étant donnée la nature chimique de ce tensio-actif. Néanmoins, la cytotoxicité très importante observée pour les 3 premières formulations pose le problème de la pertinence des résultats générés. En effet, d'après le RAR, les formulations ROUNDUP®, DIRECT® et GLIFOS® se sont révélées cytotoxiques aux niveaux de doses élevés, voire parfois aussi aux concentrations les plus faibles. Ainsi, d'après les gammes de doses testées, la 1^{ère} dose réellement interprétable se situe autour de 100 µg/boîte. Or, selon Müller *et al.* (2006), la plupart des effets mutagènes sont normalement détectables à un niveau de l'ordre de 250 µg/boîte. D'après Kenyon *et al.* (2007), la limite de détection estimée pour les mutagènes

dans le test d'Ames est la dose minimale de 250 µg/boîte. Ainsi, un test d'Ames négatif réalisé avec une dose maximale < 250 µg/boîte devrait être considéré comme non suffisamment pertinent (d'autant que la présence de tensio-actif pourrait augmenter la dose intracellulaire) et, en toute rigueur, un autre système d'essai évaluant le même endpoint devrait être mis en œuvre.

Pour les essais *in vivo*, d'après les études communiquées dans le RAR, aucune activité génotoxique n'a été observée concernant le test du micronucleus sur moelle osseuse de souris. Des phénomènes de toxicité accrue des formulations contenant des agents tensio-actifs par rapport au glyphosate seul ont également été notés. Cependant, même si on peut légitimement penser que la sensibilité du test du micronucleus *in vivo* est liée au niveau de dose testé, il n'existe pas de donnée publiée permettant de remettre en cause la pertinence de résultats négatifs au regard du niveau de dose seuil. En revanche, de façon plus globale, la sensibilité du test du micronoyau *in vivo* est considérée comme faible, ceci étant probablement lié à la faible exposition des cellules hématopoïétiques *in vivo*, comme l'ont confirmé Benigni *et al.* (2010) dans une étude avec un plus grand nombre de substances. Enfin, il faut préciser que les 4 essais du micronucleus sur moelle osseuse ont été réalisés chez la souris (3 sur la souche CD-1 et un sur la souche Swiss albino). La moelle osseuse ne semble pas être l'organe cible des études de cancérogenèse. La seule étude démontrant un excès de lymphomes malins (donc atteinte des organes lymphoïdes primaires) chez les mâles et les femelles est une étude de cancérogénicité orale sur la souris Swiss (Kumar 2001, cf. RAR).

Ainsi, les 2 seules méthodologies mises en œuvre sur ces formulations à base de glyphosate, dont la composition est identifiée, ont été le test d'Ames et le test du micronucleus *in vivo* sur moelle osseuse de souris.

L'approche test d'Ames et micronoyau *in vivo* ne correspond pas à la batterie de base de tests proposée par l'EFSA (2011) visant à évaluer le potentiel mutagène/génotoxique d'une substance. En effet, l'EFSA recommande la réalisation d'un essai bactérien de mutation reverse et d'un test *in vitro* du micronoyau (OCDE n° 487). Dans une analyse récente portant sur plus de 950 substances, Kirkland *et al.* (2011) ont confirmé que les données issues du test de mutation génique sur bactéries et du test *in vitro* du micronoyau ont permis la détection des agents cancérogènes et des substances génotoxiques *in vivo* de cette liste.

Par ailleurs, les résultats obtenus au cours des différents tests d'Ames sur les formulations, en particulier celles contenant un agent tensio-actif tel que la tallowamine (ROUNDUP®, DIRECT® et GLIFOS®) pourraient s'avérer non valides du fait du très faible niveau de dose réellement exploitable (< 250 µg/boîte). Dans ces conditions, le test d'Ames peut être considéré comme non suffisamment pertinent et un autre système d'essai évaluant le même paramètre, mutation génique *in vitro* sur cellules de mammifères, devrait être mis en œuvre. D'autre part, le test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse est reconnu comme étant peu sensible.

En conclusion, les seuls résultats du test d'Ames et du test du micronoyau *in vivo* chez les rongeurs sur les 4 formulations du glyphosate de compositions identifiées ne permettent pas de garantir l'absence de potentiel mutagène et génotoxique. L'approche basée prioritairement sur des méthodologies *in vitro*, telle que recommandée par l'EFSA (2011), devrait être mise en œuvre sur la préparation représentative.

2.1.4 Autres essais de détermination du potentiel génotoxique des formulations

Le Tableau B.6.4-29 du RAR (2015), présenté en Annexe 8, compile l'ensemble des études de génotoxicité retenues dans le cadre du RAR, publiées depuis l'année 2000 et réalisées sur le glyphosate seul ou sur des formulations du glyphosate. Les compositions de ces formulations n'apparaissent pas clairement définies dans la monographie (en particulier sur le fait de la présence ou non de formulants de type tensio-actifs).

Selon le RAR (2015), les matériaux d'essai, tels que décrits dans les publications, ont été examinés par des experts de l'industrie afin d'identifier toutes les informations utiles disponibles sur les compositions pouvant contribuer à l'évaluation de la pertinence des résultats obtenus sur le glyphosate et/ou sur les composants de ses formulations. Un problème fréquemment rencontré dans la littérature publique est l'utilisation des termes «glyphosate», «sel de glyphosate» ou «Roundup» pour indiquer une quelconque formulation à base de glyphosate contenant des composants supplémentaires tels que des agents tensio-actifs. Les résultats publiés de ces études avec des formulations différentes ont parfois été incorrectement ou de façon inappropriée attribués à la substance active.

La préparation ROUNDUP® (MON 2139), contenant 41% de sel d'IPA de glyphosate et 15,4% de MON 0818 (mélange de tensio-actif à base d'amine de suif polyéthoxylée), n'est plus commercialisée dans de nombreux marchés. Pourtant, d'autres formulations à base de glyphosate sont vendues sous la marque Roundup mais sous des formes et des concentrations de glyphosate ainsi que des systèmes tensio-actifs différents. Or, l'identification précise de l'élément d'essai est un paramètre très important dans les études toxicologiques. En particulier dans les essais de génotoxicité *in vitro* sur cellules de mammifères, l'origine des éventuels effets observés doit être évaluée afin de déterminer s'ils peuvent être dus à la toxicité ou aux conditions de culture extrêmes ou encore aux agents tensio-actifs plutôt qu'à de réelles interactions avec l'ADN. En outre, les considérations à prendre en compte sont le contrôle du pH et de l'osmolalité du milieu pour les études *in vitro* sur cultures de cellules et si les effets sont observés uniquement en présence d'une toxicité sévère. Les preuves de reproductibilité expérimentale et de significativité biologique sont également des considérations importantes dans l'évaluation des résultats expérimentaux.

D'après le RAR (2015), les critères clés définis dans les lignes directrices de l'OCDE sont rarement réunis dans les publications scientifiques. Par exemple, les données individuelles pour les cultures et les animaux ne sont généralement pas incluses dans les publications scientifiques. Ces données sont généralement résumées sous forme de moyennes. D'autres caractéristiques des lignes directrices sont plus essentielles pour démontrer les normes de qualité scientifique et devraient être considérées comme ayant plus de poids dans l'évaluation d'une étude. Par exemple, les tests de génotoxicité impliquant des observations microscopiques (aberrations chromosomiques, micronoyaux) doivent utiliser des lames codées indépendamment afin que le comptage/observation soit effectué en toute objectivité, sans connaissance de la nature des lames analysées.

Commentaires du GECU :

Etant donné le grand nombre de publications citées (Tableau B.6.4-29 du RAR, en Annexe 8), la difficulté voire l'impossibilité de retrouver la composition exacte de ces formulations à partir de leur nom commercial (pour la plupart commercialisées hors Europe), le fait que les matériels testés identifiés comme formulations du Roundup peuvent effectivement avoir des compositions différentes, rendant peu pertinente la comparaison des résultats de ces différentes études, le GECU a considéré la globalité des résultats afin de mettre en avant, de façon plus générale, la problématique des formulations donc des co-formulants du glyphosate, sans pour autant les avoir identifiés.

Une grande majorité de résultats négatifs est notée pour les études de mutation reverse sur bactéries (test d'Ames) ainsi que pour les essais du micronoyau et d'aberrations chromosomiques *in vivo* réalisés chez les rongeurs.

En revanche, des résultats significatifs ont été observés sur différents systèmes de détection d'un potentiel génotoxique utilisant différents modèles expérimentaux aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* :

- Dans le test des Comètes sur cellules HepG2 (Gasnier *et al.* 2009), dans le test des Comètes et du micronoyau sur cellules TR146 (Koller *et al.* 2012),
- Dans le test d'échanges de chromatides sœurs sur lymphocytes humains (Vigfussion and Vyse 1980, Bolognesi *et al.* 1997) et bovins (Sivikova and Dianovsky 2006),
- Fragmentation de l'ADN détectée par la technique d'elution alcaline après exposition de souris et analyse sur cellules du foie et rein (Bolognesi *et al.* 1997),
- Test des Comètes en conditions alcalines *in vivo* chez les poissons (Marques *et al.* 2015, Cavalcante *et al.* 2008, Moreno *et al.* 2014, de Souza Filho *et al.* 2013, Nwani *et al.* 2013, De Castilhos Ghisi *et al.* 2013, Gholami-Seyedkolaei *et al.* 2013, Cavas and Konen 2007).

Ainsi, si une grande majorité de résultats de génotoxicité et de mutagenèse négatifs est observée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, quelques résultats significatifs ont été observés sur des systèmes d'essai *in vitro* et *in vivo*.

Concernant ces résultats *in vitro*, le paramètre biologique commun mesuré dans les 2 études *in vitro* sur cellules humaines (Koller *et al.* 2012 ; Gasnier *et al.* 2009) est la fragmentation de l'ADN *via* le test des Comètes. Des résultats considérés comme significatifs représentent une alerte compte tenu du fait qu'il s'agit d'un test d'altération primaire de l'ADN ne permettant pas de présager du devenir des lésions de l'ADN. Les très faibles augmentations du nombre de cellules TR146 micronucléées sont directement corrélées à des augmentations significatives de nécrose et d'apoptose (Koller *et al.* 2012).

L'induction d'échanges de chromatides sœurs *in vitro* est considérée comme ayant peu de poids, En effet, si cet événement peut indiquer des remaniements chromosomiques principalement lors d'interférences avec le système de réplication/recombinaison homologue, selon les conclusions récentes de l'OCDE, ce test ne correspond pas à des phénomènes génotoxiques justifiant ainsi l'archivage de sa ligne directrice. De façon générale, les résultats significatifs obtenus sur les modèles *in vitro* représentent davantage une alerte qui doit théoriquement être confirmée ou infirmée dans des études *in vivo*.

In vivo, des résultats significatifs ont été obtenus exclusivement dans des expérimentations réalisées chez les poissons à l'exception de l'étude de Bolognesi *et al.* (1997) qui est par ailleurs criticable tant sur la voie d'exposition irréaliste utilisée que sur les niveaux de doses testés avec une dose maximale utilisée excessive au vu de la DL50 annoncée.

Le test des Comètes *in vivo* chez le poisson n'est pas conventionnel et la base de données est bien moindre que celle disponible sur les rongeurs, en particulier chez le rat qui était l'espèce utilisée lors des études interlaboratoires coordonnées en 2006-2012 par le Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM). De plus, les essais sur les modèles poisson ont été réalisés à des doses élevées voire toxiques et on ne peut pas exclure une interférence avec des phénomènes cytotoxiques plutôt qu'une interaction avec l'ADN. Les résultats ainsi générés sur le modèle poisson sont questionnables tant sur le plan de leur validation que sur le plan de leur transposition à l'homme et il n'apparaît pas pertinent de les utiliser à des fins d'évaluation des risques pour l'homme.

2.1.5 Cas de la méta-analyse de De Castilhos Ghisi *et al.* (2016)

En outre De Castilhos Ghisi *et al.* ont publié en 2016 une revue systématique et une méta-analyse de l'ensemble des résultats des tests de micronoyaux effectués sur mammifères, non mammifères et plantes, après exposition au glyphosate et/ou ses formulations, ceci afin d'établir une estimation quantitative du risque environnemental. Au total 41 publications, correspondant à 93 essais et 81 résultats d'essais, ont été utilisés pour la méta-analyse. La méta-analyse conduite sur l'ensemble des données a montré une association positive globale entre l'exposition au glyphosate ou ses formulations et une augmentation de la fréquence de formation de micronoyaux. Il existe cependant une certaine hétérogénéité, expliquée selon les auteurs, par la variabilité des espèces étudiées : souris, amphibiens, poissons, crocodiles. Par ailleurs, les méta-analyses individuelles conduites après stratification (matériel d'essai, espèce animale, sexe, voie et dose d'exposition) ont montré des réponses variables. Ainsi la fréquence de formation de micronoyaux est plus élevée avec les formulations qu'avec le glyphosate, chez les mâles et lorsque le matériel d'essai est administré par voie intrapéritonéale. En revanche, il n'a pas été possible d'établir une relation claire entre la taille des effets et les doses d'exposition lorsque l'ensemble des données est pris en compte ; enfin, il existait une corrélation négative entre la formation de micronoyaux et le temps d'exposition. Ces résultats sont attribués par les auteurs à l'utilisation de systèmes d'essais et de protocoles différents ainsi qu'aux voies d'exposition.

Commentaires du GECU :

Cette méta-analyse a été rendue possible par le grand nombre de données disponibles à la fois sur le glyphosate et sur ses formulations ; la méthode suivie par les auteurs et les différents écueils et biais de ce type d'approche sont analysés et les réponses apportées sont satisfaisantes. Cependant, la pertinence d'associer des résultats d'études menées sur des espèces très différentes pour lesquelles les paramètres d'ADME n'ont pas été déterminés, avec du matériel d'essai dont la nature exacte n'est pas toujours connue et selon des protocoles variés, peut être mise en cause. En outre la question de la transposition à l'homme de résultats obtenus chez le poisson ou le batracien est soulevée.

Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à la génotoxicité du glyphosate et/ou de ses formulations pour l'homme et devraient être vérifiés dans un contexte parfaitement maîtrisé, utilisant les standards méthodologiques validés, permettant de garantir la pertinence des résultats générés et chez une espèce pour laquelle une transposition à l'homme est plausible.

2.1.6 Conclusion relative à la génotoxicité des formulations de glyphosate

En conclusion, la diversité des formulations testées, avec leur lot d'inconnues (pourcentage de glyphosate, composition exacte en particulier la présence ou non de co-formulant(s), leur teneur lorsqu'ils sont présents ...), la diversité des systèmes d'essai mis en jeu (*in vitro*, *in vivo*, systèmes mammifères et non-mammifères, tests standardisés ou non ...), les incertitudes expérimentales, les biais relatifs aux normes de qualité scientifique ..., ne permettent pas de conclure quant à la génotoxicité et la mutagenèse de ces formulations du glyphosate. En outre on ne peut conclure sur leur capacité d'induire un effet pro-oxydant. Néanmoins, on ne peut pas totalement l'exclure et ce paramètre devrait être évalué dans une expérimentation dont le protocole devrait être préalablement validé (choix du modèle, des niveaux de doses ...).

2.2 Génotoxicité et mutagenèse du POEA

Concernant son potentiel génotoxique, selon l'EFSA (2015) (voir Annexe 3), le POEA (tallowamine ou amine de suif polyéthoxylée) a donné des résultats positifs dans un certain nombre de systèmes d'essai en raison de l'interférence avec la cytotoxicité. L'EFSA cite une étude dans laquelle une formulation à base de glyphosate, de composition non définie mais contenant de la tallowamine, a donné des résultats négatifs dans un test d'Ames, jusqu'à 500 µg/boîte sans activation métabolique et jusqu'à 1500 µg/boîte avec activation métabolique par le S9-mix. Dans un essai du micronucleus sur moelle osseuse de souris, aucune preuve d'activité génotoxique du MON 0818 (qui correspond à la tallowamine polyéthoxylée) n'a été mise en évidence à la dose la plus élevée de 555 mg/kg de poids corporel (TOX1999-242, 1992). En revanche, les auteurs signalent la présence d'une toxicité chez les souris après administration par voie intrapéritonéale unique à cette même dose. Il apparaît donc que la dose maximale acceptable par la voie IP a été utilisée.

Selon l'Efsa (2015), il a été démontré que les formulations qui contiennent des agents tensio-actifs cytotoxiques telle que la tallowamine (ou autres) pouvaient induire des dommages à l'ADN, principalement à des concentrations très élevées, par contact direct ou par formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène. L'EFSA considère qu'il y a un manque d'essais disponibles permettant d'étudier le risque de lésion de l'ADN, y compris à des concentrations inférieures au seuil de franche toxicité, ce qui serait pourtant nécessaire pour clarifier le potentiel génotoxique de la tallowamine.

L'Efsa considère que des études complémentaires sur le POEA sont nécessaires, notamment concernant son potentiel génotoxique à des doses n'induisant pas de cytotoxicité.

Selon le RAR (2015), la précédente revue a rapporté des résultats d'Ames négatifs pour le POEA (Williams *et al.*, 2000). Aucun autre résultat de génotoxicité n'a été rapporté pour le POEA seul mais de nombreux résultats de génotoxicité ont été présentés pour des formulations du glyphosate contenant du POEA, comme décrit précédemment. D'après le RAR (2015), l'examen de la littérature n'a pas permis d'identifier de nouvelles publications faisant état de résultats de génotoxicité pour le POEA testé isolément.

Commentaires du GECU :

Il faut tout d'abord rappeler que le POEA n'est pas un co-formulant de la préparation représentative à base de glyphosate. En tout état de cause, il aurait fallu s'intéresser aux co-formulants du MON 52276 (dont la composition a été fournie), puis à l'ensemble des co-formulants d'autres formulations. Par manque de temps et par défaut d'informations précises sur les compositions des formulations du glyphosate, cet exercice n'a pas pu être mené.

Les études concernant l'évaluation de la génotoxicité et la mutagenèse du POEA testé isolément sont très peu nombreuses. En effet, un test d'Ames menant à des résultats négatifs a été réalisé sur le POEA individuellement (Williams *et al.*, 2000). Dans un essai du micronucleus sur moelle osseuse de souris traitées par voie intrapéritonéale en administration unique, aucune preuve d'activité génotoxique du POEA n'a été mise en évidence à la dose la plus élevée de 555 mg /kg de poids corporel (TOX1999-242, 1992). Néanmoins, la simple mention de présence de toxicité chez la souris ne constitue pas une preuve d'exposition de la moelle osseuse, en particulier avec des substances qui présentent des pH non physiologiques comme c'est le cas pour la tallowamine. En toute rigueur, en absence de dosage sanguin et afin de s'assurer qu'à des niveaux de doses acceptables sur le plan de la symptomatologie, l'organe cible évalué a été suffisamment exposé, la description de la toxicité médullaire (par exemple au travers le rapport PCE/NCE) aurait dû être faite ce qui n'est pas le cas. De plus, le fait de préciser qu'une toxicité a été observée à la dose

maximale testée n'est pas une garantie d'absence de génotoxicité puisque précisément, des phénomènes génotoxiques peuvent tout à fait être « masqués » en présence d'une toxicité trop importante. Globalement, en absence de détail protocolaire et du rapport d'étude (suivi des recommandations de la ligne directrice de l'OCDE 474 correspondante, pertinence des doses et temps de prélèvement utilisés, interprétation générale des résultats ...) il n'est pas possible de conclure quant à la pertinence des résultats issus de cette étude et de leur interprétation.

Dans son avis de novembre 2015, l'EFSA conclut que des résultats positifs ont été obtenus dans un certain nombre de systèmes d'essai pour le POEA. En fait, dans la majeure partie des cas, ce sont des formulations à base de glyphosate contenant de la tallowamine qui ont réellement été testées et non le POEA seul. En revanche, contrairement à l'affirmation du RAR (2015), qui annonce qu'aucun autre résultat de génotoxicité n'a été rapporté pour le POEA seul, des résultats de génotoxicité ont été générés par Guilherme *et al.* (2012a) qui ont étudié l'activité génotoxique du POEA chez le poisson (*Anguilla anguilla*) en utilisant le test des Comètes standard et modifié (ajout d'enzymes de réparation de l'ADN, FPG ou EndoIII). Cependant, comme mentionné précédemment (cf. paragraphe 2.1.2.1), si des augmentations statistiquement significatives du GDI ont été observées après 1 et 3 jours de traitement, cette étude est entachée de très nombreuses incertitudes qui ne permettent pas d'utiliser ces données pour caractériser le danger génotoxique du POEA. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques (aucune indication du niveau de pureté du POEA, utilisation d'anguilles sauvages, estimation visuelle du niveau de fragmentation de l'ADN par catégorisation des noyaux, pas d'estimation des niveaux de cytotoxicité, interprétation basée uniquement sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant probablement le niveau de fragmentation de l'ADN, absence de donnée de distribution des témoins négatifs historiques ...) il n'est pas possible d'estimer la significativité biologique des éventuels effets et ces résultats ne permettent, ni de conclure quant au potentiel génotoxique du POEA, ni d'élucider un éventuel mécanisme d'action de type pro-oxydant.

Le GECU souligne également la présence de certaines impuretés (par exemple le 1,4-dioxane, cancérigène génotoxique, présent jusqu'à 300 ppm dans certains lots de POEA) (Bakke, 2007).

En conclusion, les éléments disponibles ne permettent pas de conclure sur le potentiel génotoxique du POEA *in vivo*.

3 Études de génotoxicité supplémentaires à conduire sur les préparations à base de glyphosate et sur le POEA

Les conclusions concernant l'activité génotoxique de la préparation représentative (paragraphe 2.1.1), des autres formulations (paragraphe 2.1.2 et 2.1.3) et du POEA (paragraphe 2.2) montrent des signaux d'alerte qui pourraient nécessiter des investigations complémentaires.

3.1 Études supplémentaires de génotoxicité à conduire sur la préparation représentative à base de glyphosate

Aucun test réglementaire n'est disponible pour la préparation MON 52276. Par ailleurs, comme mentionné précédemment, 2 méthodologies réglementaires ont été mises en œuvre pour les 4 formulations, dont la composition est identifiée (voir Tableaux 1 et 2) : le test d'Ames (OCDE n° 471) et le test du micronucleus *in vivo* sur moelle osseuse de rongeur (OCDE n°474).

Le test d'Ames négatif a été réalisé avec une dose maximale < 250 µg/boîte et peut donc être considéré comme non suffisamment pertinent et un autre système d'essai évaluant l'induction de mutations géniques *in vitro* devrait être mis en œuvre.

Le test du micronucleus *in vivo* sur moelle osseuse de rongeur n'est pas suffisamment sensible pour garantir l'absence de potentiel d'induction d'aberrations chromosomiques en particulier en absence de preuve d'exposition de la moelle osseuse.

Dans ces conditions, un test de mutation génique sur cultures de cellules de mammifères (par exemple le test de mutation génique au locus TK sur cellules L5178Y de lymphome de souris ou sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6, OCDE n° 490) qui permet de renseigner cet endpoint devrait être réalisé, selon la ligne directrice correspondante en vigueur et en respectant les principes des BPL. De plus, afin de répondre à la fois aux questionnements scientifiques et aux exigences réglementaires, tel que le recommande l'EFSA (2011), le test du micronucleus *in vitro* devrait être réalisé selon la ligne directrice OCDE n° 487 et en respectant les principes des BPL. L'origine de la lignée cellulaire pouvant impacter la réponse génotoxique (Honma et Hayashi, 2011), cette étude devrait être réalisée en utilisant des cellules humaines, stables sur le plan génomique, par exemple des lymphocytes humains.

Ces 2 premières méthodologies permettront de mieux appréhender la mutagenèse et la génotoxicité *in vitro* de formulations caractérisées du glyphosate.

Des études ont été générées sur différents systèmes d'essais mammifères et non-mammifères, avec des formulations de composition inconstamment définie. Ces essais, correspondant à des tests des Comètes (cf. Tableau 3 ci-dessous, extrait du Tableau B.6.4-29 du RAR, 2015, fourni en Annexe 8) ont mené à des résultats considérés comme significatifs.

Tableau 3 : Résultats des études de génotoxicité *in vivo* des formulations du glyphosate publiés à partir de 2000 (d'après le RAR, 2015)

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
<i>In Vivo DNA Damage Mammalian Systems</i>						
Spermatocytes and bone marrow	Mouse	herbazed formulation (84% glyphosate)	200 mg/kg p.o.	Positive	TO, SC, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)
SCGE blood cells, liver cells	Mouse	Glyphosate (96%) and AMPA	400 mg/kg bw/day Glyphosate or 100 mg/kg bw/day AMPA	Glyphosate and AMPA positive		Manas <i>et al.</i> , 2013 (ASB2014-6909)
<i>In Vivo DNA Damage Non-Mammalian Systems</i>						
Erythrocyte alkaline SCGE	Crasseus auratus (goldfish)	Roundup formulation	15 ppm glyphosate in water (2, 4 and 6 days)	Positive	TO, RE	Cavas and Konen, 2007 (ASB2012-11587)
Erythrocyte and gill cell alkaline SCGE	Prochilodus lineatus (tropical fish)	Roundup™ formulation (75% of 96 h LC50)	10 mg/l (6, 12 and 24h) in water	Positive	DL, TO, RE	Cavalcante <i>et al.</i> , 2008 (ASB2012-11586)
Erythrocyte alkaline SCGE	Caiman eggs/hatchlings	Roundup® Full II formulation	1750 µg/egg	Positive	RE	Poletta <i>et al.</i> 2009 (ASB2012-12002)
Erythrocyte alkaline SCGE	European eel	Roundup formulation	166 µg/liter	Positive	DL, SC, RE	Guilherme <i>et al.</i> , 2010 (ASB2012-11836)
Erythrocyte alkaline SCGE	Caiman eggs/hatchlings	Roundup® Full II formulation	Sprayed 2x with 100 l of 3%/ha 30 days apart	Positive DL, RE		Poletta <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12002)
SCGE blood cells	European eel	Roundup Ultra and Glyphosate and POAE	116 µg/l 35.7 µg/l 18.6 µg/l	positive	No increased effect of glyphosate in combination with POAE	Guilherme <i>et al.</i> , 2012 (ASB2014-7619)
SCGE	Fish (Prochilidus)	Roundup Transorb and Glyphosate	5 mg/l 2.4 mg/l	positive	Inconsistent and not clearly dose dependent	Moreno <i>et al.</i> , 2014 (ASB2014-7522)

^a MA, Mammalian metabolic activation system not used and short exposure not used;
DL, less than three dose levels used; PC, no concurrent positive control;
TO, no concurrent measurement of toxicity reported or toxicity not observed for highest dose level;
SC, independent coding of slides for scoring not indicated for visually scored slides;
RE, results not reported separately for replicate cultures or individual animals.

S'agissant de l'évaluation de la génotoxicité de la préparation représentative du RAR (qui, pour rappel, ne contient pas de POEA), on peut considérer que, des alertes existant sur certaines préparations plus ou moins bien identifiées, des essais complémentaires de génotoxicité *in vivo* chez le rongeur devraient être envisagés.

Si le comité scientifique de l'EFSA (2011) considère également comme adéquat, en tant que test de seconde intention, l'essai sur animaux transgéniques sur cellules somatiques et germinales (OCDE n° 488), étant donné qu'il s'est révélé significatif dans tous les essais sur des systèmes d'essai mammifère et non mammifère, il apparaît plus pertinent de proposer le test des Comètes *in vivo*.

Les conditions expérimentales de l'étude, résumées dans le Tableau 4 ci-après devraient être dictées par l'ensemble des résultats générés sur les différentes préparations.

Tableau 4 : Conditions de réalisation du test complémentaire *in vivo* sur la préparation représentative du glyphosate

Paramètres	Conditions	Commentaires
Espèce animale, sexe, voie et niveaux d'exposition	A définir	Il conviendra de suivre les recommandations réglementaires (stratégie EFSA de 2011 et lignes directrices de l'OCDE) et de réaliser les tests proposés ci-après chez le rongeur, par exemple la souris qui s'est révélée être l'espèce la plus sensible dans les essais de cancérogenèse.
Endpoints (critères génotoxicologiques évalués)		Résultats positifs obtenus dans le test des Comètes <i>in vivo</i> sur différents systèmes d'essai mammifères et non-mammifères et résultats contradictoires observés au cours d'essais micronoyau <i>in vivo</i> sur des systèmes non-mammifères. <i>Note</i> : Chez le rongeur, la possibilité de coupler ces 2 tests permettrait également de confirmer l'absence d'induction de micronoyaux au niveau de la moelle osseuse par la voie d'administration sélectionnée, tout en vérifiant l'exposition systémique, sans utiliser d'animaux supplémentaires.
Organes ciblés	Test des Comètes + micronucleus chez le rongeur : - Test des Comètes en investiguant au moins 2 organes du tractus gastro-intestinal (par exemple estomac et duodénum) et 2 organes systémiques (foie et rein) - Test du Micronucleus : moelle osseuse.	Organes primo-exposés par voie orale, organe systémique majeur de métabolisation et possible organe cible en cancérogenèse. Une tendance positive a été notée pour les tumeurs rénales chez la souris mâle, (mais possibilité d'un effet dû à une toxicité excessive aux fortes doses). <i>NB</i> : Depuis peu, l'ECHA recommande l'investigation d'au moins 2 organes du tractus gastro-intestinal lorsque la voie orale est utilisée (ECHA, 2016) ¹⁰ .

¹⁰ 'Evaluation Progress report 2015' qui résume les points importants concernant l'évaluation de dossiers à l'ECHA pendant une année a été publiée le 25 Février 2016, dans lequel on peut lire : "The Member State Committee recently concluded to refine the approach on requesting the *in vivo* mammalian alkaline comet assay (OECD n° 489) in rats, oral route, in particular, the MSC concluded : As a default, analyse two site-of-contact tissues (glandular stomach and duodenum/jejunum) in addition to liver."

Paramètres	Conditions	Commentaires
Autres	Test des Comètes standard et modifié (présence d'enzyme spécifique des lésions oxydées de l'ADN).	Compte tenu du possible mécanisme d'action génotoxique via l'oxydation, l'ajout d'une enzyme spécialisée dans la réparation de bases oxydées de l'ADN (8-OH-dG) permet d'augmenter la sensibilité du test vis-à-vis de ce type de lésions.
	Mesure de l'inflammation.	Des mesures de quelques médiateurs de l'inflammation permettraient d'étudier la possible interférence d'un tel phénomène sur la réponse génotoxique.
	Contrôle des concentrations dans les formulations de traitement et au niveau systémique [vérification de l'exposition du/des organe(s) systémique(s)].	Le contrôle des concentrations et la stabilité dans les solutions de traitement dans l'excipient doivent être réalisés conformément aux principes des BPL (OCDE 1997 : § 6.2 Caractérisation).

L'ensemble de ces essais *in vitro* et *in vivo* permettrait de couvrir les différents événements génétiques menant à des phénomènes de génotoxicité, en étudiant différents niveaux d'organisation (*in vitro*, *in vivo*), différents organes (cibles, primo-exposés et de cancérogenèse), des possibles mécanismes d'action (oxydation et inflammation), ce qui devrait permettre de conclure quant à la génotoxicité et la mutagenèse de la préparation représentative du glyphosate.

De plus, d'après le RAR (2015), de nombreuses données suggèrent une interférence avec des phénomènes cytotoxiques, plutôt qu'une interaction avec l'ADN, avec les formulations à base de glyphosate. Ainsi, une attention toute particulière devrait être portée sur l'évaluation de la cytotoxicité afin d'éviter toute interférence avec ces phénomènes sur la réponse génotoxique.

3.2 Études supplémentaires de génotoxicité à conduire sur le POEA

Faisant écho à la question posée et au recentrage sur la tallowamine, la recherche de données de génotoxicité a été réalisée exclusivement pour le POEA qui n'est pas un co-formulant de la préparation représentative à base de glyphosate. Les recommandations d'études complémentaires de génotoxicité présentées ci-après ne sont donc valables que pour le POEA (une recherche bibliographique et réglementaire exhaustive devrait être menée préalablement pour les autres co-formulants des préparations à base de glyphosate).

Concernant le POEA, un test d'Ames menant à des résultats négatifs a été réalisé sur ce composé (Williams *et al.*, 2000). Pour les mêmes raisons que celles avancées pour les formulations du glyphosate, les résultats pourraient s'avérer non pertinents du fait du très faible niveau de dose réellement exploitable. On ne dispose d'aucun autre résultat de test réglementaire *in vitro*.

Dans un essai du micronucleus sur moelle osseuse de souris traitées par voie intrapéritonéale en administration unique, aucune preuve d'activité génotoxique du POEA n'a été mise en évidence à la dose la plus élevée de 555 mg /kg de poids corporel (TOX1999-242, 1992). Cependant, en absence de détail protocolaire et du rapport d'étude, il n'est pas possible de conclure quant à la pertinence des résultats issus de cette étude et de leur interprétation. Globalement, le faible niveau de renseignements et les incertitudes sur la pertinence des systèmes d'essai mis en œuvre ne permettent pas de garantir l'absence de potentiel mutagène et génotoxique du POEA.

Dans ces conditions, un autre système d'essai évaluant les mutations géniques *in vitro* sur un système d'essai cellulaire devrait être réalisé (par exemple le test de mutation génique au locus TK sur cellules L5178Y de lymphome de souris ou sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6, OCDE n° 490). L'approche basée prioritairement sur des méthodologies *in vitro*, tel que recommandé par l'EFSA (2011), devant être mise en œuvre, un test du micronoyau *in vitro* devrait également être effectué, préférentiellement sur cellules humaines stables sur le plan génétique (par exemple des lymphocytes humains).

Par ailleurs, des données sur des systèmes d'essai spécifiques *in vivo* basés sur des modèles mammifère et non mammifère ont mis en avant des effets génotoxiques via le test des Comètes (cf. publications de Guilherme S., de 2012a, b et 2014). Même si ces études sont entachées de biais méthodologiques (cf. paragraphe 2.1.2), afin de lever tout doute face à ce que l'on peut qualifier d'alertes, des études complémentaires de génotoxicité *in vivo* chez le rongeur devraient être envisagées en particulier le test des Comètes *in vivo* qui pourrait être couplé au test du micronoyau sur moelle osseuse. Les conditions expérimentales devraient être similaires à celles exposées pour la préparation représentative à base de glyphosate (cf. Tableau 3). A l'instar des recommandations faites sur les études supplémentaires de génotoxicité à conduire sur la préparation représentative à base de glyphosate, une attention toute particulière devrait être portée sur l'évaluation de la cytotoxicité afin d'éviter toute interférence avec des phénomènes cytotoxiques sur la réponse génotoxique.

PROJET

4 Conclusions

Compte tenu des éléments suivants :

- Aucune étude de génotoxicité n'est disponible sur la préparation représentative du RAR,
- Concernant les 4 différentes formulations du glyphosate de composition définie, les résultats du test d'Ames et du test du micronoyau *in vivo* ne permettent pas de garantir l'absence de potentiel mutagène et génotoxique étant donnée leur faible pertinence,
- La diversité des formulations, de composition inconstamment définie, testées avec leur lot d'inconnues (pourcentage de glyphosate, composition exacte en particulier la présence ou non de co-formulant(s), leur teneur lorsqu'ils sont présents...), la diversité des systèmes d'essai mis en jeu (*in vitro*, *in vivo*, systèmes mammifères et non-mammifères, tests standardisés ou non...), les incertitudes expérimentales, les biais relatifs aux normes de qualité scientifique..., ne permettent pas de conclure quant à la génotoxicité et la mutagenèse de ces formulations du glyphosate,
- Concernant le POEA, les données disponibles ne permettent pas de conclure sur son éventuel potentiel génotoxique *in vivo*.

Des études supplémentaires sur les formulants et sur les préparations sont nécessaires afin de statuer sur leur potentiel mutagène et génotoxique. Pour répondre aux exigences réglementaires d'une part et apporter des réponses consolidées aux signaux notés dans la littérature d'autre part, des essais *in vitro* [test de mutation génique sur cultures de cellules de mammifères (par exemple le test de mutation génique au locus TK sur cellules L5178Y de lymphome de souris ou sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6, OCDE n° 490] et *in vivo* [test des Comètes chez le rongeur, qui pourrait être couplé au test du micronoyau sur moelle osseuse] seraient à mettre en œuvre.

D'une façon plus générale, dès lors que des signes d'alerte génotoxiques ou d'une autre nature seraient identifiés sur des formulations ou leurs composants, des tests appropriés devraient être envisagés. Une telle option nécessite cependant de procéder d'abord à une analyse critique approfondie du spectre de données disponibles sur le profil toxicologique de chaque composant en vue de consolider, le cas échéant, les données requises par l'évaluation réglementaire des formulations (toxicité aiguë par voie orale, dermale et inhalation, irritation cutanée et oculaire, sensibilisation). Cet exercice devrait donner lieu à la construction d'un arbre de décision, faisant apparaître des exigences basées sur la qualité et la validité des données disponibles sur des classes de « end-points », potentiellement préoccupants, autres que ceux concernant les effets sur le court terme.

Date de validation du rapport additionnel d'expertise collective par le GECU : **jj/09/2016**

5 Bibliographie

5.1 Publications

- International Agency for Research on Cancer Glyphosate Renewal Assessment Report. Volume 3 - Addendum 1 to RAR, Assessment of IARC monographs, vol 112 (2015): glyphosate. RMS Germany, 31 Aug 2015.
- International Agency for Research on Cancer Glyphosate Renewal Assessment Report. Volume 3 - Annex B.6 'Toxicology and Metabolism'. 29 January 2015 (Revised 31 march 2015). RMS Germany, Co-RMS Slovakia.
- Alvarez-Moya, C., M. R. Silva, A. R. Arambula, A. I. Sandoval, H. C. Vasquez, and R. M. Gonzalez Montes. 2011. "Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays." *Genetics and Molecular Biology* 34 (1):127-130. doi: 10.1590/S1415-47572010005000108.
- Alvarez-Moya, C., M. R. Silva, C. V. Ramirez, D. G. Gallardo, R. L. Sanchez, A. C. Aguirre, and A. F. Velasco. 2014. "Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms." *Genetics and Molecular Biology* 37 (1):105-110.
- Amer, S. M., F. A. E. Aly, A. A. Farghaly, and A. A. E. Ibrahim. 2006. "In Vitro and in Vivo Evaluation of the Genotoxicity of the Herbicide Glyphosate in Mice." *Bulletin of the National Research Centre (Egypt)* 31 (5):427-446.
- Bakke, D. 2007. Analysis of Issues Surrounding the Use of Spray Adjuvants With Herbicides. December 2002. (Revised, January 2007). Vallejo, CA.: USDA Forest Service, Pacific Southwest Region.
- Bolognesi, C., S. Bonatti, P. Degan, E. Gallerani, M. Peluso, R. Rabboni, P. Roggieri, and A. Abbondandolo. 1997. "Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (5):1957-1962.
- Cavalcante, D. G. S. M., C. B. R. Martinez, and S. H. Sofia. 2008. "Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*." *Mutation Research* 655 (1-2):41-46. doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- Cavas, T., and S. Konen. 2007. "Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay." *Mutagenesis* 22 (4):263-268. doi: 10.1093/mutage/gem012.
- Chan, P., and J. Mahler. 1992. NTP technical report on the toxicity studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicity report series, number 16*. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program.
- CIRC/IARC. 2015. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides: Diazinon, Glyphosate, Malathion, Parathion, and Tetrachlorvinphos. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Volume 112*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Claiborne, A. 1985. "Catalase activity." In *Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*, edited by R. A. Greenwald. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Coutinho Do Nascimento, A. C. and C. K. Grisola [Comparative analysis between micronuclei tests in mice and in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* in evaluation of mutagenic potential of the agrotoxins deltamethrin, dicofol, glyphosate, and imazapyr]. *Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente* 10: 41-48 (langue originale : portugais).
- Cribb, A. E., J. S. Leeder, and S. P. Spielberg. 1989. "Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)." *Analytical Biochemistry* 183 (1):195-196.
- de Castilhos Ghisi, N., and M. M. Cestari. 2013. "Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure." *Environmental and Monitoring Assessment* 185 (4):3201-3207. doi: 10.1007/s10661-012-2783-x.

- de Castilhos Ghisi, N., E. Celton de Oliveira, and A. J. Prioli. 2016. "Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review." *Chemosphere* 145:42-54. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.044.
- De Souza Filho, J., C. C. Sousa, C. C. Da Silva, S. M. De Saboia-Morais, and C. K. Grisolia. 2013. "Mutagenicity and genotoxicity in gill erythrocyte cells of *Poecilia reticulata* exposed to a glyphosate formulation." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91 (5):583-7. doi: 10.1007/s00128-013-1103-7.
- Dimitrov, B. D., P. G. Gadeva, D. K. Benova, and M. V. Bineva. 2006. "Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems." *Mutagenesis* 21 (6):375-382. doi: 10.1093/mutage/gel044.
- EFSA. 2011. "Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment." *EFSA Journal* 9 (9):2379. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2379.
- EFSA. 2015a. "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate." *EFSA Journal* 13 (11):4302. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302.
- EFSA. 2015b. "Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine." *EFSA Journal* 13 (11):4303. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4303.
- ECHA. 2016. Evaluation under REACH - Progress Report 2015 (Report no. ECHA-15-R-20-EN). Helsinki: European Chemicals Agency.
- Gasnier, C., C. Dumont, N. Benachour, E. Clair, M. C. Chagnon, and G. E. Seralini. 2009. "Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines." *Toxicology* 262 (3):184-191. doi: 10.1016/j.tox.2009.06.006.
- Gholami-Seyedkolaei, S. J., A. Mirvaghefi, H. Farahmand, and A. A. Kosari. 2013. "Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:135-141. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.011.
- Grisolia, C. K. 2002. "A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides." *Mutation Research* 518 (2):145-150. doi:10.1016/S1383-5718(02)00086-4
- Guilherme, S., I. Gaivao, M. A. Santos, and M. Pacheco. 2010. "European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup—a glyphosate-based herbicide." *Mutagenesis* 25 (5):523-530. doi: 10.1093/mutage/geq038.
- Guilherme, S., M. A. Santos, C. Barroso, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2012a. "Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms." *Ecotoxicology* 21 (5):1381-90. doi: 10.1007/s10646-012-0892-5.
- Guilherme, S., I. Gaivao, M. A. Santos, and M. Pacheco. 2012b. "DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress." *Mutation Research* 743 (1-2):1-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.017.
- Guilherme, S., M. A. Santos, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2014. "Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?" *Aquatic Toxicology* 155:213-221. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.06.007.
- Guyton, K. Z., D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Scocianti, H. Mattock, K. Straif, and IARC Lyon France International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. 2015. "Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate." *Lancet Oncology* 16 (5):490-491. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of Biological Chemistry* 249 (22):7130-7139.
- Helal, A. D., and H. M. Moussa. 2005. "Chromosomal Aberrations Induced by Glyphosate Isopropylamine Herbicide and Trials for Diminuting Its Toxicity Using Some Chemical Inactivators and Antioxidant." *Veterinary Medical Journal (Giza)* 53 (2):169-187.

- Holeckova, B. 2006. "Evaluation of the in Vitro Effect of Glyphosate-Based Herbicide on Bovine Lymphocytes Using Chromosome Painting" *Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy* 50 (4):533-536.
- Honma, M., and M. Hayashi. 2011. "Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52 (5):373-384. doi: 10.1002/em.20634.
- Ikeda, S., T. Biswas, R. Roy, T. Izumi, I. Boldogh, A. Kurosky, A. H. Sarker, S. Seki, and S. Mitra. 1998. "Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue." *Journal of Biological Chemistry* 273 (34):21585-93.
- Kaya, B., A. Creus, A. Yanikoglu, O. Cabre, and R. Marcos. 2000. "Use of the Drosophila wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36 (1):40-46.
- Kenyon, M. O., J. R. Cheung, K. L. Dobo, and W. W. Ku. 2007. "An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 48 (1):75-86. doi: 10.1016/j.yrtph.2007.01.006.
- Kier, L. D., S. D. Stegeman, J. G. Costello, and S. Schermes. 1992. Ames/*Salmonella* mutagenicity assay of RODEO® (TOX9552373). EHL study no. 91184, Project no. ML-91-441. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- Kier, L. D., S. D. Stegeman, J. G. Costello, and S. Schermes. 1992. Ames/*Salmonella* mutagenicity assay of MON 2139 (ROUNDUP® herbicide formulation) (TOX1999-239). EHL study no. 91183, Project no. ML-91-440. Report no. MSL-11729. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- Kier, L. D., S. D. Stegeman, J. G. Costello, and S. Schermes. 1992. Ames/*Salmonella* mutagenicity assay of MON 14445 (DIRECT® herbicide formulation). (TOX1999-320). EHL study no. 91185, Project no. ML-91-442. Report no. MSL-11731. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- Kirkland, D., L. Reeve, D. Gatehouse, and P. Vanparys. 2011. "A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins." *Mutation Research* 721 (1):27-73. doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.12.015.
- Koller, V. J., M. Furhacker, A. Nersesyan, M. Misik, M. Eisenbauer, and S. Knasmueller. 2012. "Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells." *Archives of Toxicology* 86 (5):805-813. doi: 10.1007/s00204-012-0804-8.
- Manas, F., L. Peralta, J. Raviolo, H. G. Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M. G. Cid, I. Larripa, and N. Gorla. 2009. "Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28 (1):37-41. doi: 10.1016/j.etap.2009.02.001.
- Manas, F., L. Peralta, L. Ugnia, A. Weyers, H. Garcia Ovando, and N. Gorla. 2013. "Oxidative stress and comet assay in tissues of mice administered glyphosate and ampa in drinking water for 14 days." *BAG. Journal of basic and applied genetics* 24 (2):67-75.
- Marques, A., S. Guilherme, I., Gaivão, MA., Santos, M., Pacheco. "Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods-insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014. Erratum in *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2015 Feb; 168:1.
- Mladinic, M., S. Berend, A. L. Vrdoljak, N. Kopjar, B. Radic, and D. Zeljezic. 2009a. "Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50 (9):800-807. doi: 10.1002/em.20495.
- Mladinic, M., P. Perkovic, and D. Zeljezic. 2009b. "Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay." *Toxicology Letters* 189 (2):130-137. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.012.
- Mohandas, J., J. J. Marshall, G. G. Duggin, J. S. Horvath, and D. J. Tiller. 1984. "Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy." *Biochemical Pharmacology* 33 (11):1801-1807.
- Monroy, C. M., A. C. Cortes, D. M. Sicard, and H. G. de Restrepo. 2005. "[Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate]." *Biomedica* 25 (3):335-345 (langue original espagnol).

- Moreno, N. C., S. H. Sofia, and C. B. Martinez. 2014. "Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (1):448-454. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.012.
- Nwani, C. D., N. S. Nagpure, R. Kumar, B. Kushwaha, and W. S. Lakra. 2013. "DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36 (2):539-547. doi: 10.1016/j.etap.2013.06.001.
- OECD (2014), Reports of the JaCVAM initiative international pre Reports of the JaCVAM initiative and validation and studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 196, OECD Publishing, Paris.
- OMS/WHO. 1994. Glyphosate. *Environmental Health Criteria no. 159*. Genève: World Health Organization.
- Piesova, E. 2004. "The influence of different treatment length on the induction of micronuclei in bovine lymphocytes after exposure to Glyphosate." *Folia Veterinaria* 3 (48):130-134.
- Piesova, E. 2005. "The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes in vitro." *Acta Veterinaria* 55 (2-3):101-109.
- Poletta, G. L., A. Larriera, E. Kleinsorge, and M. D. Mudry. 2009. "Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test." *Mutation Research* 672 (2):95-102. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.007.
- Raipulis, J., M. M. Toma, and M. Balode. 2009. "Toxicity and genotoxicity testing of roundup." *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences* 63 (1-2):29-32. doi: 10.2478/v10046-009-0009-6.
- Sivikova, K., and J. Dianovsky. 2006. "Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209 (1):15-20. doi: 10.1016/j.ijheh.2005.07.005.
- TOX1999-322.1992. Mouse Micronucleus study of DIRECT® herbicide formulation. *EHL study nos. 91202 and 91206, Project nos. ML-91-436/ML-91-439. Report no. MSL-11773*. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- TOX9552376. 1992. Mouse Micronucleus study of RODEO® herbicide formulation . *EHL study nos. 91201 and 91205, Project no. ML-91-438. Report no. MSL-11772*. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- TOX1999-242. 1992. Mouse Micronucleus study of ROUNDUP® herbicide formulation . *EHL study nos. 91200 and 91204, Project nos. ML-91-434/ML-91-437. Report no. MSL-11771*. St Louis, MO: Monsanto Environmental Health Laboratory.
- TOX1999-253. 1996. A micronucleus study in mice for the product GLIFOS®. *BioAgri Report G.1.2. – 060/96*. Sao Paulo: BioAgri on behalf of Cheminova.
- Vargas, A. A. T. 1996. The *Salmonella typhimurium* reverse mutation by GLIFOS®. (TOX1999-884). *BioAgri Report G.1.1. – 050/96*. Sao Paulo: BioAgri on behalf of Cheminova.
- Williams, G. M., R. Kroes, and I. C. Munro. 2000. "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31 (2 Pt 1):117-165. doi: 10.1006/rtph.1999.1371.

5.2 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

5.3 Législation et réglementation

OCDE. 1997. Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

OCDE. 1997. Essai n° 474: Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

OCDE. 2010. Essai n° 487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

OCDE. 2011. Essai n° 488 : Essais de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

OCDE. 2014. Essai n° 489 : Test des Comètes In Vivo en Conditions Alcalines sur Cellules de Mammifères. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

OCDE. 2015. Essai n° 490 : Essai In Vitro de Mutation Génique Sur Cellules de Mammifères Utilisant le Gène de la Thymidine Kinase. *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 "Effets sur la santé"*. Paris: OECD Publishing.

Règlement (CE) N° 1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008, relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N) 1907/2006, JOUE L 353/1 du 31 décembre 2008.

Règlement (CE) N° 1107/2009 du parlement européen et du conseil du 21 octobre 2009, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil, JOUE L 309/1 du 24 novembre 2009.

ANNEXES

- 1 - Lettre de la saisine glyphosate 2015-SA-0093
- 2 - Mandat du GECU
- 3 - EFSA 2015b. "Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine."
- 4 - Analyse Critique de l'article de Guilherme S., *et al.* "Differential genotoxicity of Roundup(®) formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms".
- 5 - Analyse Critique de l'article de Guilherme S., *et al.* "DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress".
- 6 - Analyse Critique de l'article de Guilherme S., *et al.* "Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?".
- 7 - Tableau B.6.4-29 du RAR (2015) : Genetic toxicology studies of glyphosate and glyphosate formulations published on or after 2000.

Annexe 1 : Lettre de la saisine glyphosate 2015-SA-0093

2015 -SA- 0 0 9 3

Direction générale de la prévention
des risquesDirection générale
de la santéDirection générale
du travailDirection générale
de l'alimentationDirection générale de la concurrence,
de la consommation et de la
répression des fraudes

Paris, le 8 - AVR. 2015

Objet : Saisine Anses glyphosate

Monsieur le Directeur général,

Le glyphosate est une substance très largement utilisée en tant qu'herbicide, à la fois par les professionnels (8660 tonnes commercialisées en France en 2013), mais aussi par les jardiniers amateurs (2055 tonnes commercialisées en France en 2013¹). Il fait actuellement l'objet au niveau européen d'une procédure de renouvellement de son approbation en tant que substance active phytopharmaceutique au titre du Règlement (CE) n° 1107/2009². Cette procédure est en voie de finalisation et devrait se concrétiser avant la fin de l'année par un vote des Etats membres. L'évaluation des risques des Etats membres rapporteur et co-rapporteur du dossier ne propose pas à ce jour de classification du glyphosate, notamment en tant que substance cancérigène.

Or le 10 mars dernier, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) placé auprès de l'Organisation mondiale de la santé a annoncé que le glyphosate devait désormais être classé cancérigène 2A, soit « cancérigène probable pour l'homme ». La monographie (cette monographie n'est pas annoncée comme exhaustive) qui a conduit le CIRC à proposer cette classification pour le glyphosate devrait être très prochainement rendue publique. Cette annonce du CIRC doit nous conduire à nous interroger très sérieusement sur les risques pour la santé humaine que peuvent présenter l'utilisation du glyphosate et sa présence très largement répandue dans l'environnement.

Monsieur Marc MORTUREUX
Directeur Général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT Cedex

¹ Source : BNVD Base nationale des ventes de distributeurs

² Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CE du Conseil

C'est pourquoi nous vous demandons d'examiner dans les délais les plus brefs, les travaux réalisés par le CIRC et notamment les conclusions retenues dans la monographie en cours de publication et de veiller à leur prise en compte dans l'évaluation communautaire en cours. Votre analyse permettra par ailleurs aux autorités françaises de proposer au niveau européen des mesures appropriées lors de l'examen du projet de décision de renouvellement de l'approbation. Nous vous informons que parallèlement un courrier des autorités françaises va être adressé à la Commission européenne sur ce sujet.

Nous vous prions de croire, Monsieur le Directeur général, à l'assurance de notre considération distinguée.

Pour la ministre de l'écologie, du
développement durable et de
l'énergie,
La Directrice générale
de la prévention des risques

Patricia BLANC

Pour la ministre des affaires
sociales, de la santé et des
droits des femmes,
Le Directeur général
de la santé

Pr. Benoît VALLET

Pour le ministre du travail,
de l'emploi, de la formation
professionnelle et du dialogue social,
Le Directeur général du travail,

Yves STRUILLOU

Pour le ministre de l'agriculture, de
l'agroalimentaire et de la forêt,
porte-parole du Gouvernement,
Le Directeur général de l'alimentation,

Patrick DEHAUMENT

Pour le ministre de l'économie,
de l'industrie et du numérique,
La Directrice générale
de la concurrence, de la consommation
et de la répression des fraudes

Nathalie HOMOBONO

Annexe 2 : Mandat du GECU

Groupe d'Expertise Collective d'Urgence

-sur les propositions de classement du glyphosate par le CIRC (IARC) et celui présenté dans le cadre de l'évaluation européenne ;

-sur l'évaluation de la nécessité d'études complémentaires sur les préparations à base de glyphosate.

Contexte

Le glyphosate est une substance très largement utilisée en tant qu'herbicide, à la fois par les professionnels (8660 tonnes commercialisées en France en 2013), mais aussi par les jardiniers amateurs (2055 tonnes commercialisées en France en 2013). Il fait actuellement l'objet au niveau européen d'une procédure de renouvellement de son approbation en tant que substance active phytopharmaceutique au titre du Règlement (CE) n° 1107/2009, l'Allemagne (BfR) étant l'Etat membre rapporteur. Cette procédure est en voie de finalisation et devrait se concrétiser avant la fin de l'année par un vote des Etats membres. Les évaluations¹ des Etats membres rapporteur et co-rapporteur du dossier ne proposent pas à ce jour de classification du glyphosate, en tant que substance cancérigène.

Or le 10 mars dernier, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) placé auprès de l'organisation mondiale de la santé a annoncé que le glyphosate devait désormais être classé cancérigène 2A, soit « cancérigène probable pour l'homme ». La monographie qui a conduit le CIRC à proposer cette classification a été publiée récemment².

Ces évaluations ont conduit les ministères à interroger l'Anses sur les dangers du glyphosate pour la santé humaine. L'analyse de l'Anses est attendue dans les délais les plus brefs afin de permettre aux autorités françaises de proposer au niveau européen des mesures appropriées lors de l'examen du projet de décision de renouvellement de l'approbation.

Il s'avère que l'Etat membre rapporteur a notifié à l'ECHA son intention de soumettre à la fin du mois de novembre 2015 une proposition visant à actualiser le classement du glyphosate. Cette proposition intégrera le volet relatif à la toxicité à terme et la cancérogénèse. <http://echa.europa.eu/registry-current-classification-and-labelling-intentions/-/substance-rev/10121/term>

L'Anses participera à ces travaux et transmettra des commentaires dans le cadre de la consultation publique.

Ainsi, afin de répondre aux ministères et à la consultation publique de l'ECHA, la première demande de l'Anses au GECU est **d'identifier si les éléments présentés dans les évaluations du CIRC et ceux présentés dans les évaluations du BfR dans le cadre de l'évaluation européenne^{1,2} sont de nature à soutenir une proposition de modification**

¹ - Renewal Assessment Report - Revised 31 March 2015 - Glyphosate -Volume 3, Annex B.6. - Toxicology and metabolism;
-Renewal Assessment Report - 31 August 2015 - Glyphosate addendum 1 to RAR - Assessment of IARC Monographs Volume 112 (2015):Glyphosate.

² IARC Monographs Volume 112 (2015):Glyphosate.

de la classification du glyphosate selon les règles définies dans le Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP) pour ce qui concerne les propriétés cancérigènes.

Compte tenu des délais d'instruction, l'expertise portera uniquement sur l'analyse des évaluations de l'Etat membre rapporteur et de la monographie du CIRC. Les conclusions de l'EFSA s'appuyant sur les évaluations de l'Etat membre rapporteur ne sont actuellement pas disponibles, elles seront transmises au GECU dès disponibilité.

Par ailleurs, dans le cadre de l'évaluation européenne l'Etat membre identifie une préoccupation sur la toxicité des préparations à base de glyphosate, en particulier en ce qui concerne la génotoxicité, compte tenu des résultats de deux études³ conduites sur la préparation représentative du dossier européen 'Roundup Ultra'.

Compte tenu de l'enjeu de santé important pour les utilisateurs qui peuvent être au contact des préparations, la deuxième demande de l'Anses au GECU est **d'identifier si les résultats des études de génotoxicité réalisées sur la préparation représentative du dossier européen et présentés dans les évaluations du BfR sont suffisamment robustes compte tenu des protocoles utilisés, et si ces résultats doivent conduire à des études supplémentaires sur les formulants et/ou sur les préparations à base de glyphosate. Dans le cas où des études supplémentaires seraient jugées nécessaires, il conviendra d'en préciser la nature (ou le type) en s'appuyant sur le référentiel de l'OCDE et d'indiquer si elles doivent être considérées comme essentielles à l'évaluation ou si elles peuvent être requises à titre confirmatoire.**

Organisation du GECU :

La coordination du GECU sera assurée par la DEPR, un rapport d'expertise sera produit pour chacune des questions. Ces rapports seront présentés au comité d'experts spécialisé (CES) « produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques ».

Le GECU sera constitué de quatre experts ayant des compétences dans les domaines de la classification des substances, mais également de la cancérogénèse, de la mutagénèse et de l'épidémiologie.

Le calendrier de l'expertise est le suivant :

Première question : **identifier si les éléments présentés dans les évaluations du CIRC et ceux présentés dans les évaluations du BfR dans le cadre de l'évaluation européenne^{1,2} sont de nature à soutenir une proposition de modification de la classification du glyphosate selon les règles définies dans le Règlement (CE) N° 1272/2008 (CLP) pour ce qui concerne les propriétés cancérigènes.**

³ Guilherme et al., 2012 et Guilherme et al., 2014. Dans ces études des résultats positifs ont été observés dans un test de Comètes utilisant l'Anguille européenne comme espèce.

- Réunion de lancement de l'expertise : octobre 2015, la date sera fixée en fonction de la disponibilité des experts. Les documents à analyser seront transmis aux experts courant octobre.
- Réunion du GECU (discussion sur l'analyse des experts, conclusions préliminaires) : semaine 16 novembre.
- Disponibilité du projet de rapport : 19 novembre 2015.
- Transmission du rapport final du GECU aux experts du CES « produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques » : 7 décembre 2015.
- Présentation du rapport au CES « produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques » : 16 décembre 2015.

Deuxième question : **identifier si les résultats des études de génotoxicité³ réalisées sur la préparation représentative du dossier européen et présentés dans les évaluations du BfR¹ sont suffisamment robustes compte tenu des protocoles utilisés, et si ces résultats doivent conduire à des études supplémentaires sur les formulants et/ou sur les préparations à base de glyphosate.**

- Réunion de lancement de l'expertise : janvier 2016, la date sera fixée en fonction de la disponibilité des experts. Les documents complémentaires à analyser seront transmis aux experts avant le 15 janvier.
- Réunion(s) du GECU : à programmer en février 2016.
- Finalisation du rapport : 8 mars 2016.
- Transmission du rapport aux experts du CES « produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques » : 14 mars 2016.
- Présentation du rapport au CES « produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques » : 22 mars 2016.

Date : 16/10/2015

Le directeur général



Marc Mortureux

Annexe 3 : EFSA 2015b "Request for the evaluation of the toxicological assessment of the co-formulant POE-tallowamine"

PROJET

Annexe 4 : Analyse Critique de l'article de Guilherme et al. (2012a)

1- Description de la publication

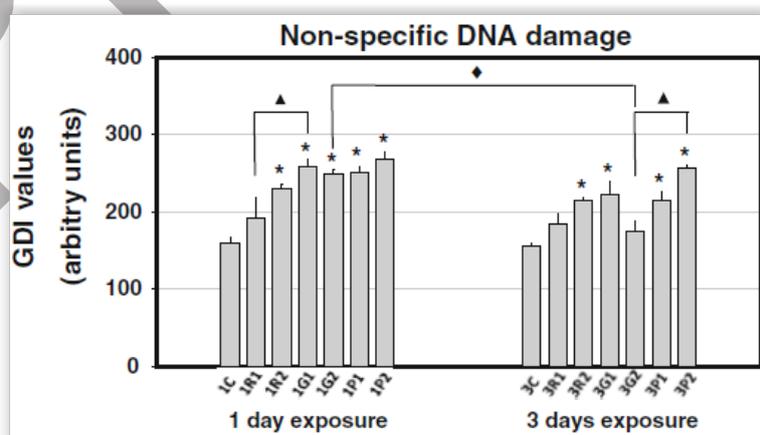
L'objectif de ce travail a été d'évaluer, chez le poisson (*Anguilla anguilla*), l'activité génotoxique d'une préparation à base de glyphosate et de déterminer l'éventuelle part relative de la substance active et d'un co-formulant, le POEA.

Les auteurs ont réalisé le test des Comètes sur les cellules sanguines d'anguilles juvéniles exposées pendant 1 ou 3 jours à des concentrations allant de 58 and 116 µg/L d'une préparation commerciale de glyphosate (ROUNDUP® ULTRA), de 17,9 et 35,7 µg/L de glyphosate seul ou de 9,3 et 18,6 µg/L de POEA. Les concentrations de glyphosate et de POEA ont été calculées en prenant comme hypothèse que 58 µg de la formulation utilisée contiennent 17,9 µg de glyphosate et approximativement 9,3 µg of POEA.

En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (FPG ou EndoIII) afin d'optimiser la mise en évidence entre autres lésions, des dommages oxydatifs de l'ADN.

Le niveau de fragmentation de l'ADN a été estimé visuellement puis les noyaux ont été classés dans 5 catégories de Comètes, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment l'intégrité de l'ADN dans la queue). Un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator) a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante : $GDI = [(\% \text{noyaux classe } 0) X0] + [(\% \text{noyaux classe } 1) X1] + [(\% \text{noyaux classe } 2) X2] + [(\% \text{noyaux classe } 3) X3] + [(\% \text{noyaux classe } 4) X4]$. Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400 et ont été comparées par une analyse statistique. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (voir Figure 1).

Figure 1 : Valeurs moyennes de GDI calculées lors du test des Comètes standard au niveau des cellules sanguines d'A. Anguilla exposées à 58 et 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA (R1, R2), ou 17,9 et 35,7 µg/L de glyphosate (G1, G2), ou 9,3 et 18,6 µg/L d'amine de suif polyéthoxylée (POEA, P1, P2), pendant 1 à 3 jours. Les différences statistiquement significatives ($p = 0,05$) sont : (*) par rapport au groupe contrôle (C) dans le même temps d'exposition; (Triangle plein) entre les traitements dans le même temps d'exposition; (Losange plein) entre les temps d'exposition dans le même traitement (d'après Guilherme et al., 2012)



Après 1 jour d'exposition, des augmentations statistiquement significatives du GDI ont été observées pour tous les types de traitement comparativement au groupe témoin négatif (excepté à la plus faible concentration de

ROUNDUP® ULTRA, 1R1). En comparant les résultats d'une exposition à la préparation avec celle à la substance active, les résultats montrent que seule la plus faible concentration de glyphosate (1G1) présente un GDI significativement augmenté par rapport à la concentration équivalente de ROUNDUP® ULTRA.

Après 3 jours d'exposition, des augmentations statistiquement significatives du GDI ont été observées pour 3R2 (ROUNDUP® ULTRA à 116 µg/L), 3G1 (17,9 µg/L de glyphosate) et dans les 2 groupes traités POEA. A la plus forte concentration, la valeur du GDI pour le POEA s'est révélée significativement supérieure à celle du glyphosate (3P2 > 3G2). Aucune différence de relation dose/effet n'a été observée quelle que soit la durée de traitement. Enfin, l'analyse des variations des valeurs des GDI dans le temps a montré une diminution pour la plus forte concentration de glyphosate (1G2 > 3G2).

D'après les auteurs, la comparaison des effets de la formulation avec ceux de ses composants montre que, la plupart du temps, la formulation ROUNDUP® ULTRA® s'est révélée moins génotoxique que la substance active ou l'agent tensio-actif testé isolément (à l'exception des concentrations plus élevées après 3 jours). De plus, les cellules sanguines des poissons exposés au ROUNDUP® ULTRA® ont toujours montré (pour les deux concentrations et les 2 temps d'exposition) un niveau de dommages à l'ADN beaucoup plus faible que prévu sur la base de la somme des effets des composants séparés, ce qui suggère une interaction antagoniste entre le glyphosate et le POEA. En outre, l'hypothèse de ce type d'interaction est renforcée par le fait que les deux composants testés individuellement, aux concentrations les plus faibles (G1 et P1), ont induit une augmentation significative de l'altération de l'ADN pour les 2 durées d'exposition, ce qui n'a pas été observé pour le ROUNDUP® ULTRA.

Les résultats du NSS_{FPG} (qui correspond à la fragmentation de l'ADN supplémentaire observée après traitement par les enzymes spécifiques) ont révélé que le risque génotoxique strictement associé à l'oxydation de l'ADN n'a eu lieu qu'après 1 jour de traitement à la concentration la plus faible de ROUNDUP® ULTRA (1R1). De plus, ce résultat reflète une interaction synergique, corroborée par les niveaux significativement plus élevés de NSS_{FPG} observés dans 1R1 par rapport à 1G1 et 1P1.

2- Commentaires sur la publication de Guilherme *et al.*, 2012a

2.1 Sur les éléments d'essai

La préparation ROUNDUP® ULTRA (distribuée par Bayer Crop-Science, Portugal) contient théoriquement 485 g/L de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine (équivalent à 360 g/L ou 30,8 % de glyphosate) et 16% de POEA. Le glyphosate a été obtenu chez Sigma-Aldrich et le POEA a été donné par le Pr. R. Belle (UMR 7150 CNRS/UPMC, Station Biologique de Roscoff, France) sous forme d'une solution à 785 g/L. Il existe des incertitudes sur la composition de la préparation car les auteurs annoncent qu'ils ont « *supposé* » que 58 µg de la formulation contiennent 17,9 µg de glyphosate et environ 9,3 µg de POEA. En toute rigueur, un contrôle des concentrations aurait dû être réalisé. Le lot de glyphosate de Sigma-Aldrich n'est pas précisé et aucune information n'est fournie sur la méthode de synthèse du POEA, sur sa pureté, sa stabilité ...

2.2 Sur le système d'essai

Si l'on se réfère à la ligne directrice OCDE 489, les rats sont couramment utilisés dans cet essai car seules des études de validation formelle du test des Comètes *in vivo* sur ces rongeurs ont été réalisées. S'il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces, cela doit être justifié d'un point de vue éthique et scientifique. Aucune information n'est donnée dans ce sens.

Les poissons utilisés dans cette études sont des anguilles sauvages qui ont été capturées dans une rivière (Mondego river mouth, Figueira da Foz, Portugal). On ne peut pas exclure une hétérogénéité plus ou moins importante entre les individus (variation pondérale des animaux?), une contamination préalable par d'éventuelles substances génotoxiques pour certains d'entre eux, des susceptibilités interindividuelles,... En toute rigueur, le niveau basal aurait dû être estimé en réalisant, avant les séquences de traitement, un test des Comètes sur les cellules sanguines de chaque individu (prélèvement minimal de sang). Par ailleurs, aucun certificat concernant la composition et garantissant la qualité sanitaire de leur alimentation n'est fournie ni-même n'est disponible.

2.3 Sur le protocole du test des Comètes

Les principales remarques portent sur l'analyse des lames.

La lecture a probablement été réalisée sans codage préalable des lames ce qui est très dommageable et l'objectivité de l'analyse ne peut pas être garantie.

La fragmentation de l'ADN a été estimée par une simple classification visuelle en 5 classes de comète, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment tout l'ADN dans la queue). Selon la ligne directrice OCDE n° 489, les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen d'un système d'analyse d'images automatique ou semi-automatique. En outre, l'absence d'un tel matériel rend impossible l'estimation du pourcentage d'ADN dans la queue qui est aujourd'hui le paramètre recommandé pour évaluer les dommages à l'ADN.

Suite à la classification visuelle, un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator), a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante :

$$\text{GDI} = [(\% \text{noyaux classe 0}) \times X0] + [(\% \text{noyaux classe 1}) \times X1] + [(\% \text{noyaux classe 2}) \times X2] + [(\% \text{noyaux classe 3}) \times X3] + [(\% \text{noyaux classe 4}) \times X4]$$

Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400.

Il semble inopportun de multiplier par « 0 » les cellules non endommagées. Celles-ci font partie intégrante de la distribution des Comètes observées et aucun rationnel ne permet de définir un indicateur qui s'affranchit de leur présence et de leur nombre.

Par ailleurs, dans l'optique d'une classification des Comètes, il est nécessaire d'exclure les cellules pour lesquelles tout ou quasiment tout l'ADN se situe dans la queue. Ces formes ont plusieurs dénominations (hedgehogs, ghost cells ou cellules fantômes, Highly Damaged Cells). Ces cellules sont considérées comme plutôt représentatives d'un état de cytotoxicité et non pas de génotoxicité bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine. En toute rigueur, il convient de les évaluer séparément et leur occurrence doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au composé testé doit être investiguée et interprétée avec soin. Dans le cas présent, non seulement ces cellules sont comptabilisées au même titre que les autres mais en plus, les auteurs leur attribuent le facteur multiplicatif le plus élevé exacerbant d'autant plus leur impact dans l'indicateur global. Ceci apparaît totalement inacceptable d'autant qu'aucune étude d'au moins un indicateur de cytotoxicité n'a été mise en œuvre ce qui confirme qu'on ne peut pas exclure une telle interférence.

Même s'il s'avère impossible de déterminer rétrospectivement le nombre de cellules pour chacune des catégories préfixées, il semble que le taux de fragmentation spontanée (témoin négatif) soit très élevé avec des GDI compris entre 150 et 200 alors même que les cellules non endommagées ne sont pas prises en compte dans le calcul de cet indicateur (on s'attendrait à voir des valeurs de GDI plus proches de 0 que de 200).

2.4 Sur l'interprétation

Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des Comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de l'espèce étudiée. En outre, le laboratoire doit mettre en place une base de données historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. Aucune information dans ce sens n'est fournie ce qui empêche l'assurance de la compétence mais aussi l'estimation de la significativité biologique des effets observés.

Les auteurs soulignent qu'après 1 jour d'exposition, le ROUNDUP® ULTRAS est révélé moins génotoxique que le glyphosate ou le POEA testé isolément et affirment que, comme le niveau de dommages à l'ADN pour la formulation est plus faible que la somme des effets des composants séparés, cela suggère une interaction antagoniste entre le glyphosate et le POEA. En fait, de nombreux autres types d'interaction peuvent avoir lieu dans le mélange au-delà d'effets génotoxiques synergiques qui ne sont pas systématiques (par exemple, des phénomènes de toxicité peuvent, de façon artéfactuelle, diminuer la partie visible de la fragmentation ...). De plus, comme les auteurs le rappellent eux-mêmes, cette observation n'a pas été faite après 3 jours de traitement ce qui n'est pas expliqué. En effet, si à la plus forte concentration, la valeur du GDI pour le POEA s'est révélée significativement supérieure à celle du glyphosate ($3P2 > 3G2$), ce n'est pas le cas à la dose inférieure ($3P1 > 3G1$).

La constatation de ce même type d'observation concernant les résultats du NSS_{FPG} (fragmentation de l'ADN supplémentaire observée après traitement par les enzymes spécifiques) n'est pas plus convaincante. En outre, les auteurs ont associé directement la fragmentation « supplémentaire » observée en présence de FPG et/ou d'ENDOIII à de l'oxydation de l'ADN ce qui est erroné. En effet, ces 2 enzymes ne sont pas spécifiques des bases oxydées de l'ADN ; en effet, si la FPG est impliquée dans la réparation de bases oxydées et modifiées (8-oxo-dG, 8-oxo-dA, Tg...), elle intervient également dans la réparation de formamido-pyrimidines (fapy-dG, fapy-dA), d'alkylations (adduits à la G) et de sites abasiques. De la même façon, parmi les bases endommagées reconnues et éliminées par ENDOIII (Endonucléase III) on retrouve principalement les dérivés d'oxydation en 5,6 de la thymine ou de la cytosine, l'urée ou le diol de thymine, thymine glycol Tg (Ikeda *et al.*, 1998).

Enfin, sur la base de 2 concentrations, il est impossible d'évaluer la nature de la relation dose avec l'effet génotoxique alors que cela représente un critère d'interprétation.

3- Conclusion

L'étude de Guilherme *et al.* (2012a) est entachée de très nombreuses incertitudes et biais méthodologiques. En outre, aucune indication du niveau de pureté du lot de glyphosate et du POEA n'est fournie. De plus, l'espèce animale utilisée n'est pas d'élevage mais sauvage et on ne peut pas exclure des variabilités interindividuelles. Concernant l'analyse, l'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN a été réalisée sans codage des lames, par catégorisation des noyaux en fonction de l'intensité et la longueur de la queue avant de calculer la valeur d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator). Celui-ci n'intègre pas les cellules non endommagées mais attribue le facteur maximal aux cellules fantômes alors qu'elles auraient dû être évaluées indépendamment. Ceci surestime *de facto* le taux de fragmentation de l'ADN réellement liée à des phénomènes génotoxiques et prend potentiellement en compte des phénomènes non génotoxiques, ce qui apparaît totalement inacceptable. Seul le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats.

Par ailleurs, aucune donnée historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce n'est présentée ce qui rend impossible l'estimation de la compétence mais aussi de l'évaluation de la significativité biologique des effets observés.

Les résultats du test des Comètes *in vivo* ainsi réalisé sur les cellules sanguines d'anguilles juvéniles exposées pendant 1 ou 3 jours à une préparation à base de glyphosate, ou à la substance active seule ou au POEA, montrent des effets statistiquement significatifs. Les auteurs soulignent qu'après 1 jour d'exposition, le ROUNDUP® ULTRA s'est révélé moins génotoxique que le glyphosate ou le POEA testé isolément et supposent une interaction antagoniste entre le glyphosate et le POEA. En fait, cette conclusion est totalement hypothétique et peu convaincante car d'une part de nombreux autres types d'interaction peuvent avoir lieu dans un mélange et, d'autre part, cette observation n'a pas été faite après 3 jours de traitement alors qu'aucune tentative d'explication n'ait été avancée. L'attribution des effets à des phénomènes de nature oxydante est totalement spéculative car aucune recherche spécifique des lésions oxydées de l'ADN n'a été réalisée.

Dans tous les cas, ces résultats significatifs peuvent ne pas être dus exclusivement à la génotoxicité, la toxicité pour les tissus cibles pouvant également se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN. Or, aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été réalisée.

L'étude de Guilherme *et al.* (2012a) ne peut pas être utilisée pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, du glyphosate ni-même du POEA. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques, l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant le taux de fragmentation de l'ADN en intégrant les cellules fantômes. De plus, à partir des 2 seules concentrations, il n'est pas possible de réaliser un test de tendance approprié afin de montrer que l'augmentation est liée à la dose. Enfin, sans donnée de distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologiques des éventuels effets.

Références

- Guilherme, S., M. A. Santos, C. Barroso, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2012a. "Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms." *Ecotoxicology* 21 (5):1381-90. doi: 10.1007/s10646-012-0892-5.
- Ikeda, S., T. Biswas, R. Roy, T. Izumi, I. Boldogh, A. Kurosky, A. H. Sarker, S. Seki, and S. Mitra. 1998. "Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue." *Journal of Biological Chemistry* 273 (34):21585-93.

Annexe 5 : Analyse Critique de l'article de Guilherme *et al.* (2012b)

1- Description de la publication

L'objectif de ce travail a été d'évaluer le potentiel génotoxique d'une préparation commerciale de glyphosate (ROUNDUP® ULTRA) chez le poisson juvénile (*Anguilla anguilla*) exposé pendant de courtes périodes (1 ou 3 jours) à des concentrations réalistes (58 et 116 µg l⁻¹), en portant un regard particulier sur l'éventuelle implication du « stress oxydatif ». La procédure standard du test des Comètes a été appliquée aux cellules de branchies et de foie. En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé exclusivement sur les cellules hépatiques avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (FPG) afin d'optimiser la mise en évidence entre autres lésions, des dommages oxydatifs de l'ADN. De plus, les activités superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion-S-transférase (GST), glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR) ainsi que la teneur totale en glutathion (GSHt) ont été déterminées dans les deux organes.

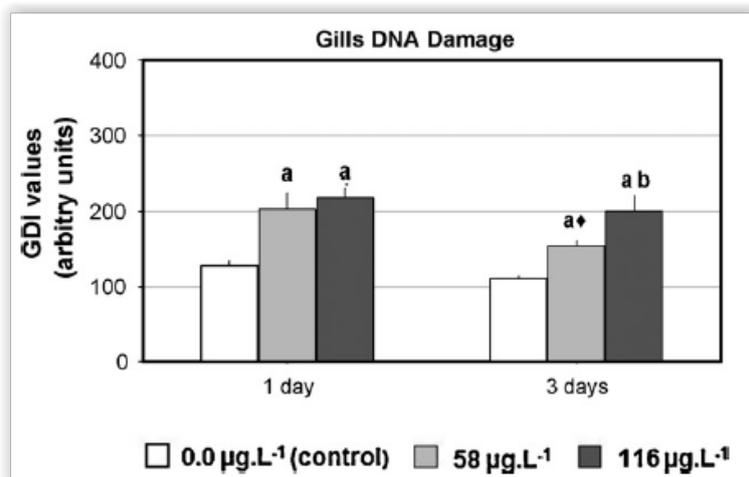
Le niveau de fragmentation de l'ADN a été estimé visuellement puis les noyaux ont été classés dans 5 catégories de Comètes, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment l'intégrité de l'ADN dans la queue). Un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator) a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante : $GDI = [(\% \text{ noyaux classe } 0) X0] + [(\% \text{ noyaux classe } 1) X1] + [(\% \text{ noyaux classe } 2) X2] + [(\% \text{ noyaux classe } 3) X3] + [(\% \text{ noyaux classe } 4) X4]$. Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400 et ont été comparées par une analyse statistique. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (voir Figures 1, 2 et 3).

La mesure des activités anti-oxydantes a été réalisée à l'aide de méthodes relativement bien détaillées et référencées (SOD : Kit Ransod Laboratories Ltd., UK ; CAT mesurée par la méthode de Claiborne ; L'activité GST mesurée avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène comme substrat selon la méthode de Habig *et al.* ; L'activité GPx déterminée selon la méthode de Mohandas *et al.* ; L'activité GR mesurée par la méthode de Cribb *et al.* ; Quantification du GSHt, par la méthode au 5,5-dithiobis-tetranitrobenzoic acid).

Résultats

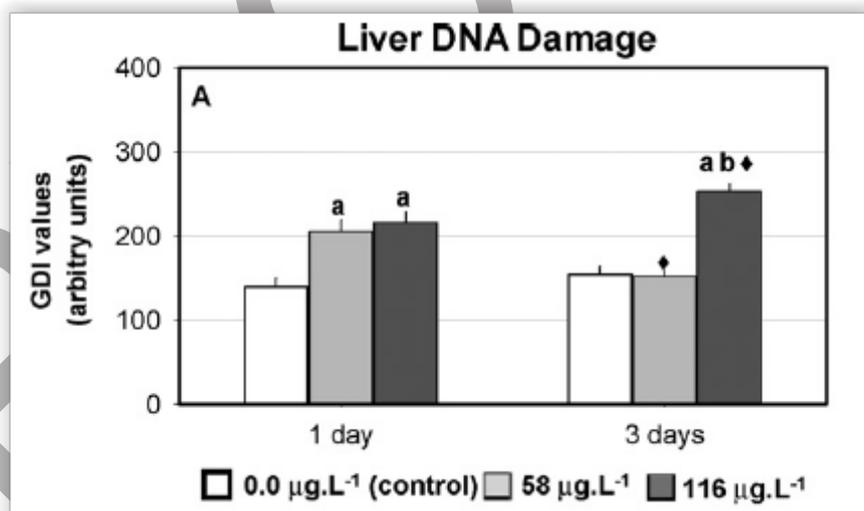
Une augmentation des valeurs de GDI des cellules de branchies a été observée dans les groupes traités par rapport aux témoins respectifs aussi bien après une exposition de 1 jour qu'après 3 jours (voir fig. 1). Les auteurs ont noté que, dans l'ensemble, le GDI s'est révélé être dose-dépendant et que la seule modification significative liée au temps a été une diminution du GDI entre 1 jour et 3 jours d'exposition mais uniquement pour la concentration de 58 µg/L de ROUNDUP® ULTRA.

Figure 1 : Valeurs moyennes de GDI obtenues dans le test des Comètes standard au niveau des cellules de branchies d'*A. Anguilla* exposées à 58 et 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA pendant 1 à 3 jours. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont : (a) par rapport au groupe contrôle et (b) par rapport au groupe 58 µg/L (dans la même durée d'exposition) ; (♦) par rapport à 1 jour d'exposition (pour la même condition d'exposition) (*d'après Guilherme et al., 2012b*).



Une augmentation des valeurs de GDI des cellules de foie a été observée dans les groupes traités par rapport aux témoins respectifs après une exposition de 1 jour (voir fig. 2). Après 3 jours de traitement, le GDI s'est révélé statistiquement augmenté uniquement à la concentration de 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA.

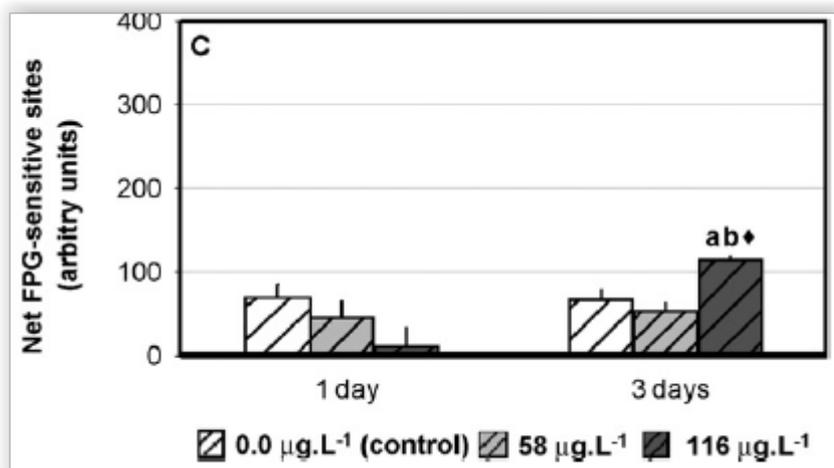
Figure 2 : Valeurs moyennes de GDI obtenues dans le test des Comètes standard au niveau des cellules de foie d'A. Anguilla exposées à 58 et 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA pendant 1 à 3 jours. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont : (a) par rapport au groupe contrôle et (b) par rapport au groupe 58 µg/L (dans la même durée d'exposition) ; (♦) par rapport à 1 jour d'exposition (pour la même condition d'exposition) (d'après Guilherme *et al.*, 2012b)



En présence de FPG, des différences significatives ont été retrouvées exclusivement après l'exposition de 3 jours pour le groupe 116 µg/L (Fig. 3).

Figure 3 : Valeurs moyennes de GDI « nets » (calculés par différence entre les valeurs GDI en présence de FPG et GDI sans FPG) obtenues dans le test des Comètes modifié (+FPG) au niveau des cellules de foie d'A. Anguilla exposées à 58 et 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA pendant 1 à 3 jours. Les différences

statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont (\blacklozenge) par rapport à 1 jour d'exposition (pour la même condition d'exposition) (d'après Guilherme *et al.*, 2012b)



Concernant la mesure des activités anti-oxydantes au niveau des cellules de branchies, une augmentation significative a été retrouvée uniquement pour l'activité CAT dans le groupe 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA après une exposition de 3 jours. La comparaison entre 1 et 3 jours d'exposition met en évidence une diminution significative de l'activité GPx dans les deux groupes traités et de la teneur GSH dans le groupe 116 µg/L.

Vis-à-vis du foie, aucune modification n'a été observée dans les réponses anti-oxydantes à l'exception d'une diminution significative de l'activité de la SOD dans le groupe 58 µg/L après l'exposition de 3 jours.

D'après les auteurs, ces résultats indiquent clairement le potentiel du ROUNDUP® ULTRA à induire de la fragmentation de l'ADN vis-à-vis des cellules branchiales aux deux concentrations d'essai (58 et 116 µg/L) et aux 2 temps d'exposition (1 et 3 jours). Après une exposition de 1 jour, les résultats ont démontré que le ROUNDUP® ULTRA affecte l'intégrité de l'ADN des cellules hépatiques aux 2 concentrations d'exposition, sans relation dose-effet. En prolongeant la durée d'exposition, seule la concentration la plus élevée a présenté une augmentation du GDI.

Globalement, il n'y a pas d'indication d'un état pro-oxydant accru au niveau du foie, les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques étant restés inchangés dans toutes les conditions d'exposition.

2- Commentaires sur cette publication

De nombreux commentaires sont communs à la publication parue dans Ecotoxicology en 2012.

2.1 Sur le système d'essai

Si l'on se réfère à la ligne directrice OCDE 489, les rats sont couramment utilisés dans cet essai car seules des études de validation formelle du test des Comètes *in vivo* sur ces rongeurs ont été réalisées. S'il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces, cela doit être justifié d'un point de vue éthique et scientifique. Aucune information n'est donnée dans ce sens.

Les poissons utilisés dans cette études sont des anguilles sauvages qui ont été capturées dans une rivière (Mondego river mouth, Figueira da Foz, Portugal). On ne peut pas exclure une hétérogénéité plus ou moins importante entre les individus (variation pondérale des animaux, fond génétique ...), une contamination par d'éventuelles substances génotoxiques pour certains d'entre eux Par ailleurs, aucun certificat concernant la composition et garantissant la qualité sanitaire de leur alimentation n'est fournie ni-même n'est disponible.

2.2 Sur le protocole du test des Comètes (analyse des lames) :

La lecture a probablement été réalisée sans codage préalable des lames, ce qui est très dommageable et l'objectivité de l'analyse ne peut pas être garantie.

La fragmentation de l'ADN a été estimée par une simple classification visuelle en 5 classes de comète, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment tout l'ADN dans la queue. Selon la ligne directrice OCDE n° 489, les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen de systèmes d'analyse d'image automatiques ou semi-automatiques. En outre, l'absence d'un tel matériel rend impossible l'estimation du pourcentage d'ADN dans la queue qui est aujourd'hui le paramètre recommandé pour évaluer les dommages à l'ADN.

Suite à la classification visuelle, un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage indicator) a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante :

$$\text{GDI} = [(\% \text{noyaux classe 0}) X0] + [(\% \text{noyaux classe 1}) X1] + [(\% \text{noyaux classe 2}) X2] + [(\% \text{noyaux classe 3}) X3] + [(\% \text{noyaux classe 4}) X4]$$

Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400.

Il semble inopportun de multiplier par « 0 » les cellules non endommagées. Celles-ci font partie intégrante de la distribution des Comètes observées et aucun rationnel ne permet de définir un indicateur qui s'affranchit de leur présence et de leur nombre.

Par ailleurs, dans l'optique d'une classification des Comètes, il est de coutume d'exclure les cellules pour lesquelles tout ou quasiment tout l'ADN se situe dans la queue. Ces formes ont plusieurs dénominations (hedgehogs, ghost cells ou cellules fantômes, Highly Damaged Cells). Ces cellules sont considérées comme plutôt représentatives d'un état de cytotoxicité et non pas de génotoxicité bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine. En toute rigueur, il convient de les évaluer séparément et leur occurrence doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au composé testé doit être investiguée et interprétée avec soin. Dans le cas présent, non seulement ces cellules sont comptabilisées au même titre que les autres mais en plus, les auteurs leur attribuent le facteur multiplicatif le plus élevé exacerbant d'autant plus leur impact dans l'indicateur global. Ceci apparaît totalement inacceptable.

Même s'il s'avère impossible de déterminer rétrospectivement le nombre de cellules pour chacune des catégories préfixées, il semble que le taux de fragmentation spontanée (témoin négatif) soit très élevé avec des GDI compris entre 150 et 200 alors même que les cellules non endommagées ne sont pas prises en compte dans le calcul de cet indicateur (on s'attendrait à voir des valeurs de GDI plus proches de 0 que de 200).

2.3 Interprétation

Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des Comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de l'espèce étudiée. En outre, le laboratoire doit mettre en place une base de données historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. Aucune information dans ce sens n'est fournie ce qui empêche toute estimation de la compétence mais aussi de la significativité biologique des effets observés.

Les auteurs soulignent qu'après une exposition d'1 jour, aucune augmentation significative n'est observée dans les résultats concernant les scores de GDI obtenus en présence de FPG, sous-entendu qu'aucune oxydation n'a lieu après une période de 24 h de traitement. Les auteurs indiquent même que l'oxydation n'est pas un mécanisme pertinent de dommages. A l'inverse, après 3 jours d'exposition, les auteurs relèvent des augmentations des scores de GDI obtenus en présence de FPG dans le groupe 116 µg/L et les interprètent comme présence de purines oxydées. Cette interprétation est erronée car l'enzyme FPG n'est pas spécifique des bases oxydées. D'autre part, quand une cellule, un organisme est exposé à une substance ayant des propriétés pro-oxydantes, les effets sont plus immédiats, rapides et une éventuelle « adaptation » peut avoir lieu avec le temps précisément parce que des processus d'induction des systèmes antioxydants vont se mettre en place. Il apparaît donc étonnant qu'un phénomène inverse soit observé ici.

De plus, comme le soulignent eux-mêmes les auteurs, cette observation faite dans l'essai comète modifié (+FPG) n'a pas été accompagnée d'une activation des systèmes antioxydants, les auteurs de conclure que les dommages oxydatifs ne peuvent pas être prédits sur la base de variations des paramètres antioxydants !

Etant donnée la batterie de mesure des systèmes antioxydant (SOD, CAT, GST, GPx, GR et quantification du GSHt), cette conclusion n'apparaît pas crédible. Cette batterie complète ne démontrant pas de variation significative, quelle que soit la dose, quel que soit le temps de traitement, l'induction d'oxydation (directe et/ou indirecte) n'apparaît pas être un mécanisme d'action possible.

3- Conclusion

L'étude de Guilherme *et al.* (Mutation Research 2012b) est entachée de très nombreuses incertitudes et biais méthodologiques. En outre, aucune indication du niveau de pureté du lot de glyphosate n'est fournie. De plus, l'espèce animale utilisée n'est pas d'élevage mais sauvage et on ne peut pas exclure des variabilités interindividuelles.

Concernant l'analyse, l'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN a été réalisée sans codage des lames, par catégorisation des noyaux en fonction de l'intensité et la longueur de la queue avant de calculer la valeur d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator). Celui-ci n'intègre pas les cellules non endommagées mais attribue le facteur maximal aux cellules fantômes alors qu'elles auraient dû être évaluées indépendamment. Ceci surestime de facto le taux de fragmentation de l'ADN réellement liée à des phénomènes génotoxiques et prend potentiellement en compte des phénomènes non génotoxiques, ce qui apparaît totalement inacceptable. Seul le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats.

Ci-dessous, des exemples de valeurs 'extrêmes' démontrant les limites non acceptables de ce type de mesure non conventionnelle :

	Nombre de cellules par catégorie					Calcul GDI selon Guilherme <i>et al.</i> , 2012 ⁽¹⁾	Calcul d'un indicateur intégrant les cellules non endommagées et excluant les cellules fantômes ⁽²⁾
	0	1	2	3	4		
Cas N°1	70	0	0	0	30	120	70
Cas N°2	70	30	0	0	0	30	130
Cas N°3	70	10	10	10	0	60	160
Cas N°4	90	0	0	10	0	30	130

(1) $GDI = [(\% \text{noyaux classe } 0) X0] + [(\% \text{noyaux classe } 1) X1] + [(\% \text{noyaux classe } 2) X2] + [(\% \text{noyaux classe } 3) X3] + [(\% \text{noyaux classe } 4) X4]$

(2) $\text{Indicateur} = [(\% \text{noyaux classe } 0) X1] + [(\% \text{noyaux classe } 1) X2] + [(\% \text{noyaux classe } 2) X3] + [(\% \text{noyaux classe } 3) X4] + [(\% \text{noyaux classe } 4) X0]$

On peut s'apercevoir qu'avec des valeurs de 70 % de cellules en classe « 0 » et 30 % de cellules en classe « 4 » (Cas N°1), on obtient la valeur de GDI la plus élevée. Pourtant, ces données pourraient tout-à-fait correspondre à celles d'un témoin négatif pour lesquelles on observerait 30% de cellules fortement endommagées car cela correspond en fait à la limite acceptable de toxicité. A l'inverse, en valorisant les cellules non endommagées (classe « 0 ») et en excluant les cellules fantômes (classe « 4 »), le cas N°1 conduit à la valeur minimale comparativement aux autres cas qui présentent des cellules endommagées dans les différentes classes devant être intégrées au comptage. Les cas N° 2 et 4 qui présentent pourtant des cellules endommagées dans les classes 1 et 3 respectivement, conduisent pourtant aux valeurs les plus basses.

Ces exemples caricaturaux démontrent que le GDI selon Guilherme *et al.* (2012) n'est absolument pas pertinent.

Par ailleurs, aucune donnée historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce n'est présentée ce qui rend impossible l'estimation de la compétence mais aussi de l'évaluation de la significativité biologique des effets observés.

Les résultats du test des Comètes *in vivo* en conditions alcalines réalisé chez l'anguille juvénile exposée pendant 1 ou 3 jours à une préparation à base de glyphosate montrent des effets statistiquement significatifs vis-à-vis des cellules de branchies. Des effets significatifs ont également été observés dans les cellules de foie après une exposition de 1 jour aux 2 doses testées mais uniquement à la concentration de 116 µg/L de ROUNDUP® ULTRA après 3 jours de traitement. Dans tous ces cas, ces résultats significatifs pourraient ne pas être dus à une génotoxicité mais à des phénomènes confondants de toxicité or, aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été réalisée.

Aucune augmentation significative n'est observée au cours du test des Comètes modifié (en présence de FPG) signifiant qu'aucune oxydation n'a lieu après une période de 24 h de traitement. A l'inverse, après 3 jours d'exposition, des augmentations des scores de GDI ont été obtenus en présence de FPG dans le groupe dose maximale de 116 µg/L. Cet effet n'est pas accompagné d'une activation des systèmes antioxydants alors qu'une batterie de mesure a été réalisée (SOD, CAT, GST, GPx, GR et quantification du GSht). En absence de variation significative de systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques et avec un effet significatif exclusivement après 3 jours d'exposition dans le groupe dose forte dans le test des Comètes modifié, l'oxydation n'apparaît pas être un mécanisme d'action plausible.

L'étude de Guilherme *et al.* (2012b) ne peut être utilisée ni pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, ni pour élucider un possible mécanisme d'action génotoxique. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques, l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant le taux de fragmentation de l'ADN en intégrant les cellules fantômes. Sans donnée de

distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologiques des éventuels effets. Enfin, avec un effet significatif dans des conditions expérimentales très limitées et sans modification claire des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques mesurés, la démonstration d'un potentiel effet génotoxique via un mécanisme d'action oxydant n'est pas faite.

Références

Guilherme, S., I. Gaivao, M. A. Santos, and M. Pacheco. 2012b. "DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress." *Mutation Research* 743 (1-2):1-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.017.

PROJET

Annexe 6 : Analyse Critique de l'article de Guilherme et al. (2014)

1- Description de la publication

L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel génotoxique de 2 préparations commerciales d'herbicides (ROUNDUP® ULTRA et GARLON® ayant comme substance active respective le glyphosate et le triclopyr, *i.e.*, ester de butyl glycol) chez le poisson (*Anguilla anguilla*) exposé pendant une période de 3 jours à 1 concentration de ROUNDUP® ULTRA, en portant un regard particulier sur l'éventuelle implication du « stress oxydatif » et en estimant le recouvrement des éventuelles dommages observés après des périodes sans traitement. L'objectif de cette critique bibliographique étant destiné au glyphosate et à ses formulations, seuls les résultats obtenus pour le Roundup® Ultra sont analysés ci-après.

Ainsi, des anguilles juvéniles (*Anguilla anguilla* L.) ont été exposées à la seule concentration de 116 µg l⁻¹ de ROUNDUP® ULTRA pendant 3 jours puis ont été transférées dans une eau sans herbicide pendant 1, 7 et 14 jours (= périodes post-exposition). Le test des Comètes a ensuite été réalisé sur les cellules sanguines pour chaque période d'exposition et post-exposition. En plus du protocole standard, un test des Comètes modifié a été réalisé avec l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN (endonucléase III, EndoIII ou formamidopyrimidine glycosylase, FPG) afin d'optimiser la mise en évidence entre autres lésions, des dommages oxydatifs de l'ADN.

Le niveau de fragmentation de l'ADN a été estimé visuellement puis les noyaux ont été classés dans 5 catégories de Comètes, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment l'intégrité de l'ADN dans la queue). Un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator) a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante : $GDI = [(\% \text{ noyaux classe } 0) \times 0] + [(\% \text{ noyaux classe } 1) \times 1] + [(\% \text{ noyaux classe } 2) \times 2] + [(\% \text{ noyaux classe } 3) \times 3] + [(\% \text{ noyaux classe } 4) \times 4]$. Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400 et ont été comparées par une analyse statistique. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (voir Figures 1, 2 et 3).

Résultats

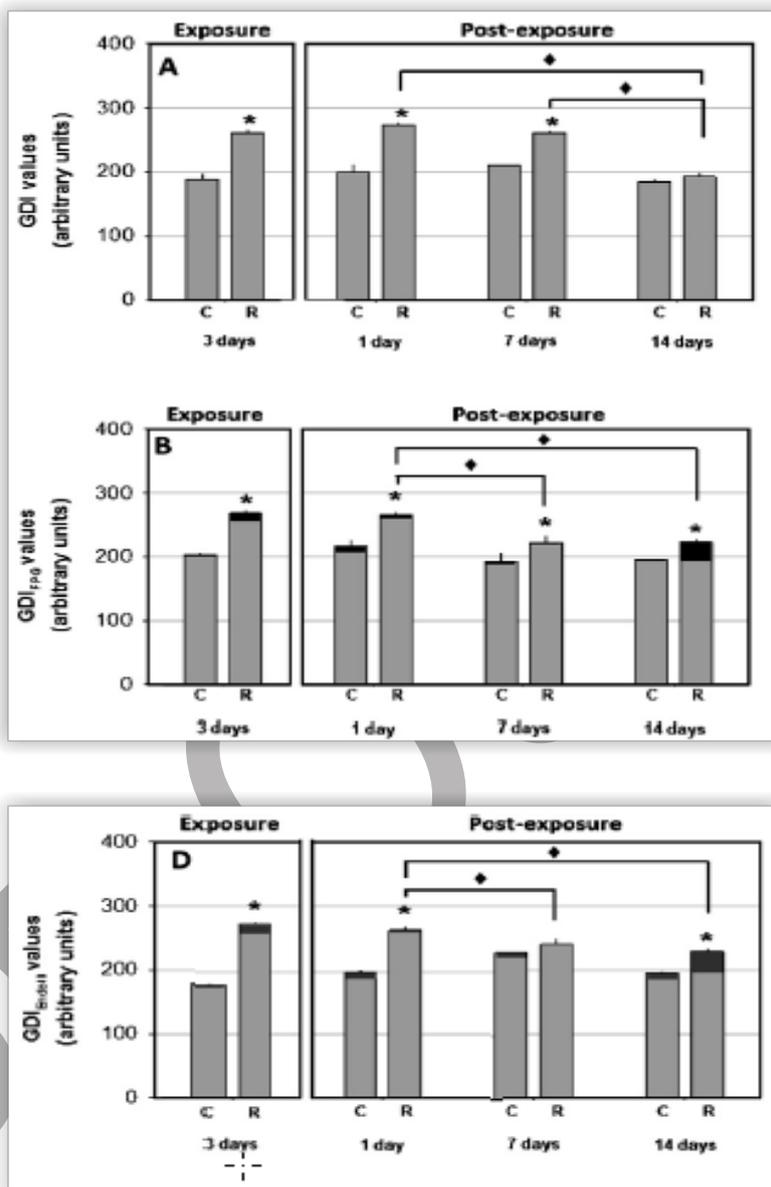
Des augmentations des valeurs de GDI des cellules sanguines ont été observées dans les groupes traités par rapport au groupe témoin (voir 1^{ers} encadrés des figures 1A, B et D).

Après recouvrement (voir 2^{nds} encadrés des figures 1A, B et D), seuls les groupes correspondant aux périodes post-exposition de 1 ou 7 jours ont montré des différences significatives par rapport à leur contrôle respectif. Le groupe de 14 jours sans ROUNDUP® ULTRA révèlent des diminutions significatives des valeurs de GDI par rapport aux 2 autres groupes de 1 et 7 jours post-exposition.

Concernant le test des Comètes modifié (+ EndoIII), des augmentations des valeurs de GDI ont été observées après 3 jours d'exposition au ROUNDUP® ULTRA. Après des périodes de recouvrement de 1, 7 et 14 jours, des augmentations significatives ont également été observées. Le groupe traité + 1 jour post-exposition a montré des valeurs de GDI les plus élevées par rapport aux groupes 7 et 14 jours après exposition.

Figure 1 : Valeurs moyennes de GDI obtenues dans le test des Comètes au niveau des cellules sanguines d'A. Anguilla exposées pendant 3 jours à 116 µg/L de Roundup® et soumis à une période sans herbicide pendant 1, 7 et 14 jours (post- exposition) ; (A) valeurs mesurées dans le test des Comètes standard; (B) valeurs mesurées dans le test des Comètes modifié (= GDI en gris) et fragmentation supplémentaire 'nette' correspondant aux sites FPG-sensibles (=NSSFPG en noir); (D) valeurs mesurées dans le test des Comètes modifié (= GDI en gris)

et fragmentation supplémentaire 'nette' correspondant aux sites EndoIII-sensibles (NSSEndoIII en gris foncé); Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont : (*) par rapport au groupe contrôle (C) dans le même délai d'exposition ; (♦) entre les temps de recouvrement pour une même durée de traitement. (d'après Guilberme et al., 2014)



D'après les auteurs, l'implication apparente de dommages oxydatifs à l'ADN a également été confirmée pour le ROUNDUP® ULTRA.

Concernant le devenir des lésions de l'ADN après traitement (essais avec recouvrement de 1, 7 et 14 jours), les résultats montrent une diminution du GDI sur les dommages de l'ADN avec le temps de recouvrement dans l'essai standard jusqu'à atteindre des résultats non significatifs après 14 jours dans l'eau sans herbicide, tandis que les valeurs de GDI après traitement à la FPG ou à l'EndoIII ne montrent pas de « rétablissement » complet. D'après les auteurs, la persistance des dommages à l'ADN après 14 jours de recouvrement coïncide avec l'apparition tardive de cassures de l'ADN correspondant à des sites sensibles aux enzymes ce qui semble indiquer une décroissance progressive de la protection antioxydante associée à l'incapacité de réparer ce type particulier de dommages.

D'après les auteurs, ces résultats démontrent une action indirecte du ROUNDUP® ULTRA sur l'ADN, liée à la formation d'ERO se produisant dans une phase tardive dû au cycle redox des constituants de ROUNDUP® ULTRA générant des ERO et/ou inhibant/épuisant les défenses antioxydantes.

Les auteurs concluent à un recouvrement (lésions de l'ADN non détectées) lorsque l'on considère les dommages de l'ADN non spécifique (GDI) après 14 jours post-exposition, tandis que GDIFPG et GDI EndoIII n'ont pas mis en évidence de restauration complète de l'ADN.

2- Commentaires sur cette publication

De nombreux commentaires sont communs aux 2 publications parues dans Ecotoxicology et Mutation Research en 2012.

2.1 Sur le système d'essai

Si l'on se réfère à la ligne directrice OCDE 489, les rats sont couramment utilisés dans cet essai car seules des études de validation formelle du test des Comètes *in vivo* sur ces rongeurs ont été réalisées. S'il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces, cela doit être justifié d'un point de vue éthique et scientifique. Aucune information n'est donnée dans ce sens.

Les poissons utilisés dans cette études sont des anguilles sauvages qui ont été capturées dans une rivière (Mondego river mouth, Figueira da Foz, Portugal). On ne peut pas exclure une hétérogénéité plus ou moins importante entre les individus (variation pondérale des animaux, fond génétique,...), une contamination par d'éventuelles substances génotoxiques pour certains d'entre eux,.... Par ailleurs, aucun certificat concernant la composition et garantissant la qualité sanitaire de leur alimentation n'est fournie ni-même n'est disponible.

2.2 Sur le protocole du test des Comètes (analyse des lames) :

Une seule dose a été testée ce qui empêche toute évaluation d'une éventuelle relation dose-effet qui est l'un des 3 paramètres d'interprétation. La lecture a probablement été réalisée sans codage préalable des lames ce qui est très dommageable et l'objectivité de l'analyse ne peut pas être garantie.

La fragmentation de l'ADN a été estimée par une simple classification visuelle en 5 classes de comète, selon l'intensité et la longueur de la queue, de 0 (pas de queue) à 4 (quasiment tout l'ADN dans la queue). Selon la ligne directrice OCDE 489, les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen de systèmes d'analyse d'image automatiques ou semi-automatiques. En outre, l'absence d'un tel matériel rend impossible l'estimation du pourcentage d'ADN dans la queue qui est aujourd'hui le paramètre recommandé pour évaluer les dommages à l'ADN.

Suite à la classification visuelle, un score total exprimé sous forme d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage indicator) a été calculé en multipliant le pourcentage de noyaux dans chacune des classes par un facteur correspondant selon la formule suivante :

$$\text{GDI} = [(\% \text{noyaux classe 0}) X0] + [(\% \text{noyaux classe 1}) X1] + [(\% \text{noyaux classe 2}) X2] + [(\% \text{noyaux classe 3}) X3] + [(\% \text{noyaux classe 4}) X4]$$

Les valeurs de GDI sont exprimées en unité arbitraire dans une échelle allant de 0 à 400.

Il semble inopportun de multiplier par « 0 » les cellules non endommagées. Celles-ci font partie intégrante de la distribution des Comètes observées et aucun rationnel ne permet de définir un indicateur qui s'affranchit de leur présence et de leur nombre.

Par ailleurs, dans l'optique d'une classification des Comètes, il est de coutume d'exclure les cellules pour lesquelles tout ou quasiment tout l'ADN se situe dans la queue. Ces formes ont plusieurs dénominations (hedgehogs, ghost cells ou cellules fantômes, Highly Damaged Cells). Ces cellules sont considérées comme plutôt représentatives d'un état de cytotoxicité et non pas de génotoxicité bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine. En toute rigueur, il convient de les évaluer séparément et leur occurrence doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au composé testé doit être investiguée et interprétée avec soin. Dans le cas présent, non seulement ces cellules sont comptabilisées au même titre que les autres mais en plus, les auteurs leur attribuent le facteur multiplicatif le plus élevé exacerbant d'autant plus leur impact dans l'indicateur global. Ceci apparaît totalement inacceptable.

Même s'il s'avère impossible de déterminer rétrospectivement le nombre de cellules pour chacune des catégories préfixées, il semble que le taux de fragmentation spontanée (témoin négatif) soit très élevé avec des GDI compris entre 150 et 200 alors même que les cellules non endommagées ne sont pas prises en compte dans le calcul de cet indicateur (on s'attendrait à voir des valeurs de GDI plus proches de 0 que de 200).

2.3 Interprétation

Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des Comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de l'espèce étudiée. En outre, le laboratoire doit mettre en place une base de données historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. Aucune information dans ce sens n'est fournie ce qui empêche toute estimation de la compétence mais aussi de la significativité biologique des effets observés.

Les auteurs indiquent des augmentations des valeurs de GDI lors des essais modifiés en présence d'enzymes et des « augmentations » après les périodes de recouvrement avec notamment le groupe traité post-exposition 1 jour démontrant les valeurs les plus élevées. Quand on examine les figures, en présence de FPG ou d'Endo III, cette interprétation apparaît totalement tendancieuse. D'une part, on remarque que les valeurs avec enzymes juste après traitement sont équivalentes voire légèrement inférieures aux essais sans enzyme (cf figure 1B, D vs 1A). D'autre part, pour les essais avec FPG, les valeurs à 7 et 14 jours sont du même niveau que celui des contrôles négatifs (après traitement et même celui de la version standard) ce qui démontre que ces niveaux de GDI sont dans des gammes de valeurs négatives. En présence d'Endo III les mêmes observations peuvent être faites. L'absence de données historiques (du test standard et modifié) fait particulièrement défaut pour l'interprétation dans ce cas précis.

De plus, il est reconnu qu'il ne peut pas y avoir d'accumulation de lésions primaires de l'ADN (sauf si une substance génotoxique s'accumulait elle-même et générerait ce type d'événements en continu). Or, comme le souligne les auteurs eux-mêmes, le glyphosate a un faible potentiel de bioaccumulation (OMS, 1994) ce qui pose la question du rationnel scientifique de cette étude.

Globalement, sur la base de ces données, on ne peut pas conclure à un effet pro-oxydant immédiat ou « retard » ce qui apparaît cohérent avec l'étude précédente (2012b) qui ne démontrait pas de variation significative des systèmes antioxydant investigués.

3- Conclusion

L'étude de Guilherme *et al.* (2014) est entachée de très nombreuses incertitudes et biais méthodologiques. En outre, aucune indication analytique du lot de Roundup® Ultra n'est fournie. De plus, l'espèce animale utilisée n'est pas d'élevage mais sauvage et on ne peut pas exclure des variabilités interindividuelles.

Concernant l'analyse, l'estimation du niveau de fragmentation de l'ADN a probablement été réalisée sans codage des lames, par catégorisation des noyaux en fonction de l'intensité et la longueur de la queue avant de calculer la valeur d'un indicateur, le GDI (Genetic Damage Indicator). Celui-ci n'intègre pas les cellules non endommagées mais attribue le facteur maximal aux cellules fantômes alors qu'elles auraient dû être évaluées indépendamment. Ceci surestime de facto le taux de fragmentation de l'ADN réellement liée à des phénomènes génotoxiques et prend potentiellement en compte des phénomènes non génotoxiques, ce qui apparaît totalement inacceptable. Seul le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats.

Par ailleurs, aucune donnée historique établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce n'est présentée ce qui rend impossible l'estimation de la compétence mais aussi de l'évaluation de la significativité biologique des effets observés.

Les résultats du test des Comètes *in vivo* en conditions alcalines réalisé sur les cellules sanguines d'anguilles juvéniles exposées pendant 3 jours à une préparation à base de glyphosate montrent des augmentations statistiquement significatives diverses des valeurs de GDI lors des essais standard et modifiés (présence d'enzymes) sans ou avec des périodes de recouvrement. Néanmoins, les valeurs de GDI avec enzymes juste après traitement sont équivalentes voire légèrement inférieures aux essais sans enzyme. Pour les essais avec FPG ou EndoIII, après recouvrement, les valeurs obtenues à 7 et 14 jours sont du même niveau que celui du contrôle négatif juste après traitement (et même celui de la version standard) ce qui démontre que ces valeurs sont dans des gammes de valeurs négatives. Ces « effets » ne peuvent donc pas être considérés comme biologiquement significatifs.

Le rationnel de cette étude n'est pas correctement étayé. En effet, les auteurs ont recherché des lésions primaires de l'ADN jusqu'à 14j post-exposition alors qu'il ne peut pas y avoir d'accumulation de lésions primaires de l'ADN. De plus, le glyphosate a un faible potentiel de bioaccumulation (OMS, 1994). Finalement, si une augmentation avérée de la fragmentation avait été observée, il n'aurait probablement pas pu être attribué à un effet direct.

Globalement, sur la base de ces données, on ne peut pas conclure à un effet pro-oxydant immédiat ou « retard » ce qui apparaît cohérent avec l'étude précédente (2012b) qui ne démontrait pas de variation significative des systèmes antioxydant investigués.

L'étude de Guilherme *et al.* (2014) ne peut être utilisée, ni pour caractériser le danger génotoxique de la formulation à base de glyphosate, ni pour élucider un possible mécanisme d'action génotoxique. Au-delà de très nombreux biais méthodologiques dans des conditions expérimentales très limitées (une seule dose), l'interprétation n'est basée que sur les résultats d'un test statistique réalisé sur un indicateur surestimant le taux de fragmentation de l'ADN en intégrant les cellules fantômes. Sans donnée de distribution des témoins négatifs historiques, il n'est pas possible d'estimer la significativité biologiques des éventuels effets.

Références

Guilherme, S., M. A. Santos, I. Gaivao, and M. Pacheco. 2014. "Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?" *Aquatic Toxicology* 155:213-221. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.06.007.

PROJET

Annexe 7 : Point de vue divergent exprimé par X

X ne partage pas l'analyse qui a été faite des articles de Guilhermé *et al.*, pour diverses raisons qui relèvent de la méthodologie et de l'interprétation des données. De plus sur la base des résultats publiés ainsi que des études il ne soutient pas tous les termes de la conclusion générale. Enfin, la proposition d'études supplémentaires sur les formulants, certes nécessaire doit à son avis aller au-delà de tests réglementaires classiquement attendus. Ci-après les points de divergence et une conclusion différente:

a/ Articles de Guilhermé et al.

- Sur la méthode, un article scientifique n'a pas à mon avis à être analysé sur la base de critères BPL et de lignes directrices, mais sur la base des critères partagés par la communauté scientifique. Les résultats publiés dans un article scientifique doivent pouvoir être reproduits par d'autres laboratoires, c'est la base de l'avancée des connaissances. Une étude commandée par un industriel est construite sur la base de lignes directrices. Il n'est pas logique de demander que les expérimentations d'un article scientifique répondent à une ligne directrice OCDE, ce n'est pas l'objectif. En revanche la qualité de l'expérimentation peut être questionnée, mais j'aboutis à une analyse différente de celle rapportée dans les annexes 4, 5 et 6. En outre, concernant les articles de Guilhermé et al. dont les expériences reposent sur l'essai des comètes, la ligne OCDE 489 (comet assay in vivo) a été publiée en septembre 2014 et on ne peut légitimement l'invoquer pour des articles mais aussi des études antérieures.

- Sur l'analyse des articles publiés par Guilhermé et al. (2012a, b et 2014) rapportée successivement dans les annexes 4, 5 et 6. Comme les critiques sont récurrentes pour chacun des articles, mon analyse est organisée sur la base des biais méthodologiques invoqués dans ces annexes, sur le modèle utilisé et sur la qualité de l'équipe publiante.

1- Biais méthodologiques/incertitudes réels ou non?

1-1 « l'espèce animale utilisée n'est pas d'élevage mais sauvage et on ne peut pas exclure des variabilités interindividuelles ». Si la variabilité interindividuelle est élevée, on devrait s'attendre à un essai comète avec une déviation standard élevée. Ce n'est pas en accord avec les données publiées et de plus l'effet statistiquement significatif entre le groupe traité et témoin n'en a que plus de poids.

1-2 « Concernant l'analyse, aucune indication concernant le codage des lames n'est fournie ». Il est non seulement réglementairement mais aussi scientifiquement attendu que la lecture des lames soit réalisée en aveugle. Ce n'est pas spécifié mais on ne peut conclure ni dans un sens ni dans l'autre.

1-3 Expression des résultats : GDI au lieu d'une analyse d'image. « seul le pourcentage d'ADN de queue (intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats selon la ligne directrice de l'OCDE n°489 ». Ce mode d'expression des résultats en 5 classes avec un maximum de 400 pour le GDI, a été proposé par un des leaders du domaine, A Collins, ainsi que la quantification des sites sensibles à l'une des enzymes du Base excision Repair (Endo III ou FPG) (Collins A, 2004, Mol Biotechnol. 1682 citations ; Azqueta et al, 2009, Mutat res.). Les classes sont les suivantes : « 0 (no tail) to 4 (almost all DNA in tail) in class 1 (undamaged nucleoids) ». Un facteur multiplicatif est utilisé : 0 pour la classe 0 mais cela n'a aucun impact car le pourcentage de cellules en classe 0 est 0 ! L'exemple caricatural « 70 %

de cellules en classe « 0 » et 30 % de cellules en classe « 4 » (Cas N°1)... » n'est pas pertinent car il n'y a pas de cellules en classe 0 et l'analyse des données peut être conduite sur la base du pourcentage de cellules dans chaque classe. Plus important, quelle est la conclusion d'une analyse différentielle de résultats obtenus par la technique GDI et par l'analyse d'image ? Ainsi que rapporté par Collins et al. une corrélation est trouvée entre ces deux méthodes de quantification (Collins et al. Environ Mol Mutagenesis 1997, Collins et al. Mutagenesis 2008).

« On s'attendrait à voir des valeurs de GDI plus proches de 0 que de 200 » est surprenant car il est spécifié que la classe 1 correspond à « undamaged nucleoids » et puisqu'aucune cellule n'est retrouvée en classe 0, la valeur contrôle ne peut être 0 mais au minimum 100.

En conclusion l'analyse en 5 classes est acceptée et a été validée par la communauté scientifique qui a participé à l'écriture de la ligne OCDE 489 et n'a donc pas à être rejetée, bien qu'en 2016 il soit attendu d'utiliser l'analyse d'image pour quantifier les résultats.

1-4 « témoins positifs et négatifs pour le tissu étudié chez cette espèce non présenté ». Le témoin négatif pour l'analyse des résultats est le contrôle. Contrairement à cette affirmation, un témoin positif a été utilisé (Guilhermé et al 2012b) : « The positive control (cells treated with H₂O₂) displayed an average GDI of 291.7 (± 8.28) arbitrary units, showing to be significantly higher than the negative control and both Roundup treatments ». D'autre part l'analyse d'autres articles issus de ce laboratoire montre que des témoins positifs sont utilisés.

1-5 « L'attribution des effets à des phénomènes de nature oxydante est totalement spéculative car aucune recherche spécifique des lésions oxydées de l'ADN n'a été réalisée » est une phrase surprenante car la seule technique assez sensible et limitant les artéfacts de préparation des échantillons est la spectrométrie de masse couplée HPLC. Peu de laboratoires européens sont susceptibles de générer des résultats fiables et l'objet des publications utilisant l'essai des comètes n'est pas de démontrer la présence de bases oxydées mais d'obtenir cette information par l'utilisation d'enzymes reconnaissant ces dommages.

1-6 « la toxicité pour les tissus cibles pouvant également se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN. Or, aucune évaluation de la cytotoxicité n'a été réalisée ». Page 22 : « De plus, les essais sur les modèles poisson ont été réalisés à des doses élevées voire toxiques et on ne peut pas exclure une interférence avec des phénomènes cytotoxiques plutôt qu'une interaction avec l'ADN ».

Il est vrai que la mesure de la toxicité doit être réalisée car les processus de mort cellulaire induisent un artéfact dans l'analyse que l'on retrouverait en classe 4. Pourquoi le présupposé d'une toxicité est-il erroné ? Tout d'abord les concentrations choisies (58 et 116 µg/ml) reposent sur une analyse de la pollution environnementale : « Taking as a departing point the genotoxicity of Roundup (at environmentally realistic levels) demonstrated in fish (Guilhermé et al. Mutagenesis, 2010), the major purpose of this work was to improve the knowledge on the DNA damaging. Autre argument : « In general, these estimates have proven to be correct, since concentrations of glyphosate were detected in the range 75–90 µg L⁻¹ in the Orge watershed (France) (Botta F et al. Chemosphere 2009) and higher levels (0.5–1.0 mg L⁻¹) than those predicted were sporadically found following direct application to water (WHO, Glyphosate: Environmental Health Criteria 159, 1994). Ce sont donc des concentrations retrouvées dans l'environnement sans induction de mortalité chez les poissons.

Ensuite le pourcentage de cellules en classe 4 d'anguilles exposées au Roundup reste très faible ce qui représente un indicateur de faible voire d'absence de létalité. D'autre part les

anguilles sont suivies pendant 14 jours après une exposition de 3 jours à 116 µg/ml sans effet toxique rapporté (Guilhermé et al. 2014).

De plus de nombreux articles analysant le stress oxydant induit par différentes préparations à base de glyphosate chez les poissons sont conduites à des concentrations dans une gamme allant de 0,2 à 20 mg/L (V. Langiano et al. *Comp. Biochem. Physiol*, 2008; O. Lushchak et al. *Chemosphere*, 2009 ; L. Gluszcak, *Comp. Biochem. Physiol.*, 2007 ; Modesto et al. *Chemosphere* 2010...). Les valeurs des EC50 chez les poissons pour les formulations à base de glyphosate à 2 jours sont de 5.3-5600 mg/L et à 21 jours de 1.4-4.9 mg/L (WHO 1994).

Ainsi, les concentrations utilisées ne sont pas toxiques pour l'anguille.

1-7 « En absence de variation significative de systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, et avec un effet significatif exclusivement après 3 jours d'exposition dans le groupe dose forte dans le test des Comètes modifié, l'oxydation n'apparaît pas être un mécanisme d'action plausible ».

Cette affirmation aurait dû être plus mesurée. En effet le système antioxydant repose à la fois sur un réseau enzymatique et des structures chimiques classiquement dosées par l'essai 'Thiobarbituric Acid Reactive Substances' (TBARS) révélateur d'une peroxydation lipidique qui peut aussi être constestable pour le suivi d'un stress oxydant. Les systèmes enzymatiques testés répondent à des seuils d'activation et après exposition à diverses formulations de Roundup chez les poissons des résultats contradictoires sont rapportés avec absence de modification (Manas L. et al. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009), diminution d'activité (Modesto KA et al. *Chemosphere* 78 et 80, 2010) et parfois augmentation (O. Lushchak et al. *Chemosphere*, 2009 ; L. Gluszcak, *Comp. Biochem. Physiol.*, 2007). Une interprétation sur l'absence d'induction d'enzymes du système rédox peut reposer sur un seuil non atteint en raison de la faible concentration de Roundup utilisée.

1-8 Concernant l'article de 2014 : « Le rationnel de cette étude n'est pas correctement étayé. En effet, les auteurs ont recherché des lésions primaires de l'ADN jusqu'à 14 jours post-exposition alors qu'il ne peut pas y avoir d'accumulation de lésions primaires de l'ADN ».

Cette assertion est surprenante puisque que les auteurs indiquent « Taking as the point of departure the genotoxic potential of Roundup® and Garlon®, considering environmentally realistic concentrations, the present study intended to shed a light on the ability of fish to recover from the DNA damage exerted by short-term exposures to these herbicide formulations upon the exposure cessation, thereby contributing to a realistic perspective of the risk assessment ». La question posée est celle d'une analyse de la génotoxicité après exposition au Roundup.

1-9 « Par ailleurs, aucun certificat concernant la composition et garantissant la qualité sanitaire de leur alimentation n'est fournie ni-même n'est disponible ».

Certes il n'est pas présenté d'analyse chimique des aliments mais la comparaison est réalisée entre anguilles contrôles et traitées. De plus les anguilles ne sont pas alimentées pendant le traitement.

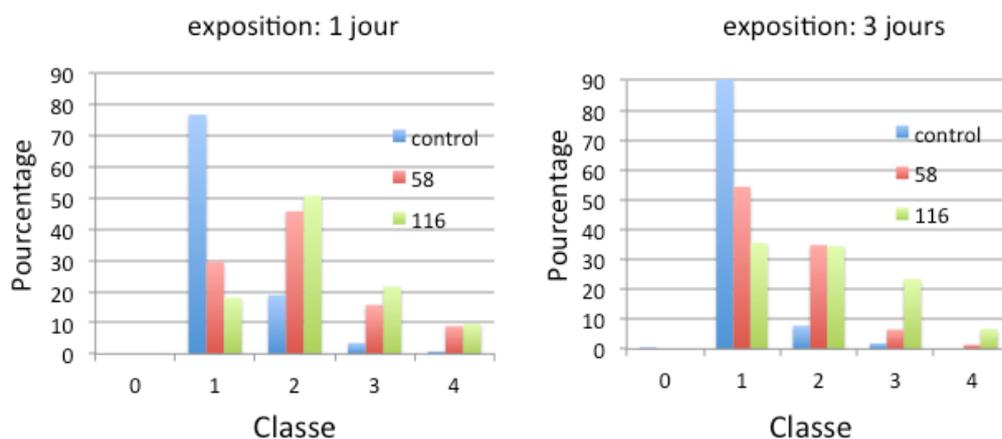
1-10 « D'une part, on remarque que les valeurs avec enzymes juste après traitement sont équivalentes voire légèrement inférieures aux essais sans enzyme (cf figure 1B, D vs 1A) ».

Cette affirmation est fautive puisque les valeurs avec traitement enzymatiques sont supérieures comme il peut être constaté sur le différentiel (positif) rapporté dans les Fig. 1C et E.

1-11 Analyse réalisée par classe d'endommagement des nucléoides

Les données des tableaux publiés sont reprises et exprimées en histogramme (moyennes, sans tenir compte de la déviation standard de chaque valeur)

Guilhermé 2012b (Fig sur les données du Tableau 1)

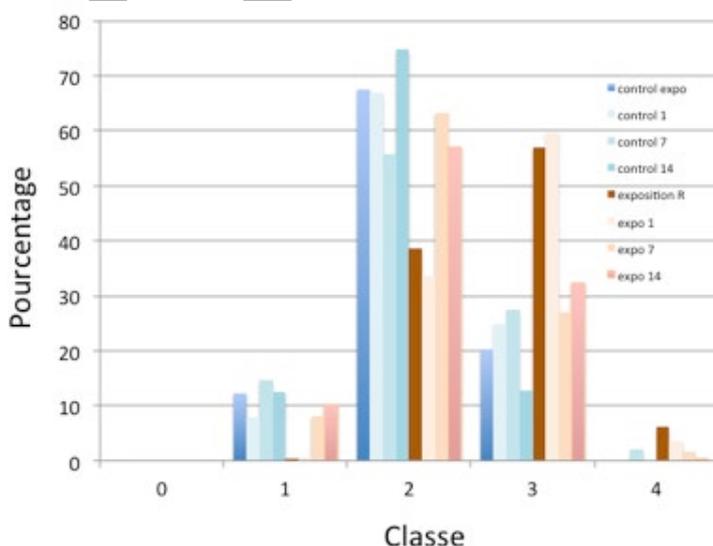


On constate un effet génotoxique sur les cellules de branchies avec une diminution du pourcentage de cellules en classe 1 et augmentation dans les 3 autres classes par rapport au contrôle. On observe un très faible effet dose objectivé sur les classes 1 et 3. Le résultat est similaire pour les hépatocytes (Table 2 de l'article).

Il est vrai que l'article Guilhermé 2012a est de faible qualité, mais en revanche celui publié dans Mutat. Res. rapporte des expérimentations conduites selon un protocole maîtrisé et les données rapportées démontrent un effet génotoxique aux concentrations utilisées. Cependant la production de lésions oxydatives de l'ADN n'est pas observée.

Guilhermé 2014 (Fig. sur les données du Tableau 4)

On constate un retour aux valeurs contrôles après 14 jours de croissance des anguilles en absence de toxique, après les 3 jours de traitement.



En revanche, une augmentation du nombre de sites FPG sensibles (Fig 2 de l'article) après 14 jours avec un traitement à la plus forte dose (116 µg/ml) est un résultat non attendu et l'explication donnée est peu convaincante. Il est aussi possible que les érythrocytes ne représentent pas les cellules issues du tissu adéquat pour répondre à la question d'un stress oxydant. En effet, dans un article du même laboratoire (Marques A et al., Comparative Biochem et Physiol. Part C, 2014) le suivi du potentiel génotoxique du Roundup est réalisé sur des hépatocytes selon le même protocole expérimental. On n'observe pas d'augmentation de signal pour les animaux traité après 14 jours de post-incubation (voir Fig 1 de l'article).

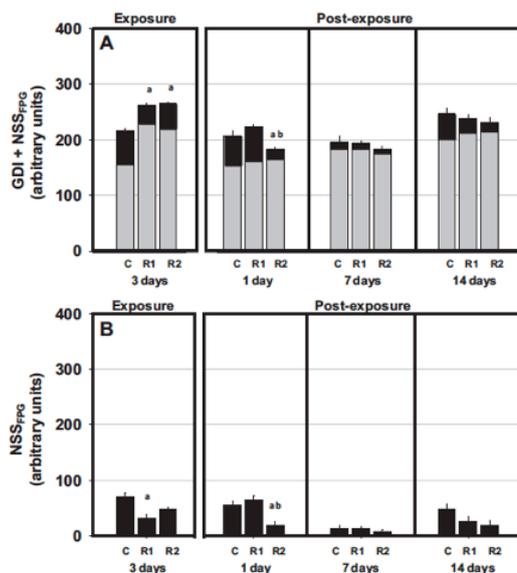


Fig. 1. Mean values of DNA damage, measured by the comet assay in liver cells of *A. anguilla* exposed to 58 and 116 µg L⁻¹ of Roundup® (R1 and R2, respectively) for 3 days (Exposure) and 1, 7 and 14 days after transference to herbicide-free water (post-exposure). Values resulted from the assay with an extra step of digestion with formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) to detect oxidized purine bases: (A) overall damage (GDI_{FPG}) and partial scores, i.e. genetic damage indicator (GDI) after the standard comet assay (gray) and additional DNA breaks corresponding to net FPG-sensitive sites (NSS_{FPG}; black); (B) NSS_{FPG} alone. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are: (a) versus control and (b) versus R1 (within the same exposure/post-exposure time). Bars represent the standard error.

2- Le modèle

L'anguille n'est pas un modèle couramment utilisé en toxicologie des composés chimiques. Cependant en écotoxicologie les modèles poissons et autres espèces aquatiques comme la daphnée représentent des modèles pertinents. Il serait intéressant de qualifier les bases mécanistiques et moléculaires de la plus forte sensibilité des modèles poissons vis à vis de la toxicité du glyphosate et des formulations. Il est sans doute probable que l'ajout de surfactants comme le POEA soient particulièrement toxiques pour ces espèces. Un des intérêts des publications de Guilhermé et al. concerne l'utilisation de différents tissus (branchies, érythrocytes nucléés, foie) avec des valeurs de GDI variable sur les contrôles. Une des limites du système concerne le niveau de base GDI (120 à 200) aboutissant à une amplitude d'effets qui est faible. Ainsi les données numériques par classe sont nécessaires pour évaluer un effet génotoxique.

3- Le laboratoire

S. Guilhermé était doctorante (d'après la publication de 2010) dans l'équipe dirigée par M Pacheco (<https://scholar.google.fr/citations?user=ziWaeB4AAAAJ&hl=fr>). L'analyse de la production de ce responsable d'équipe indique un nombre total d'articles supérieur à 140, un facteur h de 36 et plus de 3800 citations (environ 2500 depuis 2011). L'article de 2010 (Guilhermé et al., Mutagenesis) posant la question de la génotoxicité d'une formulation de glyphosate sur le modèle de l'anguille est cité 45 fois et celui de 2012 (Mutat Res) 39 fois. Cette équipe est reconnue par la communauté

des toxicologues et les critiques émises sur les articles sont contestables, comme évoqué précédemment.

Le point faible vient du fait que seule l'équipe portugaise ait testé cette formulation et donc que le résultat provienne d'un seul modèle expérimental et d'une seule technique. Ces articles en revanche n'apportent pas à mon avis de conclusion convaincante sur un effet pro-oxydant de la formulation testée qui peut-être en rapport avec la faible concentration utilisée. En effet à de plus forte concentration de nombreux articles font mention d'un effet pro-oxydant de formulations Roundup chez les poissons (V. Langiano et al. Comp. Biochem. Physiol, 2008; O. Lushchak et al. Chemosphere, 2009 ; L. Gluszcak, Comp. Biochem. Physiol., 2007 ; Modesto et al. Chemosphere 2010...)

b/ avis sur la conclusion relative à la génotoxicité des formulations de glyphosate

En conclusion, la diversité des formulations testées avec leur lot d'inconnues (pourcentage de glyphosate, composition exacte en particulier la présence ou non de co-formulant(s), leur teneur lorsqu'ils sont présents ...), la diversité des systèmes d'essai mis en jeu (*in vitro*, *in vivo*, systèmes mammifères et non-mammifères, tests standardisés ou non ...), les incertitudes expérimentales..., ne permettent pas de conclure définitivement quant à la génotoxicité et la mutagenèse de ces formulations du glyphosate. Cependant un faisceau de résultats convaincants représente une véritable alerte sur un effet génotoxique induit par différentes formulations (essai des comètes et essai des micronoyaux). En outre l'effet pro-oxydant retrouvé principalement chez les poissons devrait être recherché sur d'autres modèles dans une expérimentation avec un design validé (choix du modèle, des niveaux de doses, de la voie d'exposition ...).

c/ Sur la génotoxicité et mutagenèse du POEA

Des résultats de génotoxicité ont été générés par Guilherme et al. (2012a) qui a étudié l'activité génotoxique du POEA chez le poisson (*Anguilla anguilla*) en utilisant le test des comètes standard et modifié (l'ajout d'enzymes de réparation de l'ADN, FPG ou EndoIII). Cependant, si des augmentations statistiquement significatives du GDI (indicateur de catégorisation des figures de Comètes) ont été observées après 1 et 3 jours de traitement, cette étude est la seule relative à la question posée. Une confirmation sur un autre modèle est attendu pour caractériser le danger génotoxique du POEA.

d/ conclusion concernant les conditions de réalisation d'un test complémentaire sur la préparation représentative du glyphosate :

Comme les résultats positifs ont été obtenus sur une seule espèce, l'anguille, un test complémentaire devrait reposer sur une autre espèce. Les rongeurs utilisés classiquement en toxicologie peuvent être proposés pour répondre à une demande réglementaire. Concernant le mécanisme d'action génotoxique l'essai des comètes *in vivo* serait adapté et l'espèce à définir. La question de la mutagenèse ponctuelle devrait être abordée soit *in vitro* (essai sur gène TK, OCDE n° 49), soit *in vivo* (OCDE n° 488).

A mon avis la pertinence du choix de la formulation représentative peut être posée et en conséquence l'intérêt de tests complémentaires. N'est-il pas plus utile de sélectionner quelques formulations renfermant des surfactants de composition connue ? Le choix serait dicté par le volume des ventes, l'utilisation des préparations, la structure des surfactants et autres composés ainsi que leurs concentrations. Il me semble plus intéressant d'évaluer les préparations plutôt que les surfactants et le glyphosate seuls, car l'effet mélange n'est pas toujours prévisible.

Si le nombre de formulation est faible la génotoxicité pourrait être recherchée *in vivo* sur les hépatocytes et cellules branchiales et hépatocytes de poissons. La mutagenèse pourrait être abordées sur cellules *in vitro* TK+/- . En fonction des résultats l'essai des micronoyaux *in vivo* chez le rongeur permettrait de conclure.

Si le nombre de formulations à tester est élevé et sur la base d'un patron d'expression de gènes caractéristiques d'un effet génotoxique chez le poisson zèbre et validé par la communauté scientifique, l'analyse de l'expression des gènes me semble représenter un outil d'intérêt pour un criblage avant l'utilisation d'essais réglementaires.

Date de validation de l'Annexe 7 par X : 6/08/2016

Annexe 8 : Tableau B.6.4-29 du RAR (2015) : Genetic toxicology studies of glyphosate and glyphosate formulations published on or after 2000

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
<i>In Vitro Gene Mutation</i>						
Point mutation	Ames strains	Perzocyd 10 SL formulation	2 µg/plate (toxic)	Negative	TA1535 not used	Chruscielska <i>et al.</i> , 2000, (ASB2013-9830)
Wing spot test	Drosophila	glyphosate (96%)	10 mM in larval stage	Negative/inconclusive	Negative or crosses not sensitive to recombination events	Kaya <i>et al.</i> , 2000, (ASB2013-9832)
<i>In Vitro Chromosome Effects—Mammalian Systems</i>						
Cytokinesis block micronucleus	Bovine lymphocytes	Glyphosate formulation (62% glyphosate Monsanto source)	560 µM 48 h – S9	Positive?	PH, MA, SC, TO	Piesova, 2004 (ASB2012-12001)
Cytokinesis block micronucleus	Bovine lymphocytes	Glyphosate formulation (62% glyphosate Monsanto source)	560 µM 48 h – S9 2 h – S9 2 h +S9	Positive? Negative Negative	PH, SC, TO	Piesova, 2005 (ASB2012-12000)
Chromosome aberration	Mouse spleen cells	herbazed formulation	50 µM?	Positive	Concentrations used not clear. PH, MA, SC, TO, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)
Chromosome aberration	Bovine lymphocytes	Glyphosate formulation (62% glyphosate) Monsanto source	1.12 mM (toxic) (24 h)	Negative	Chromosome 1 FISH analysis. PH, MA, PC, SC, TO, RE	Holeckova, 2006 (ASB2012-11847)
Chromosome aberration	Bovine lymphocytes	Glyphosate formulation (62% glyphosate) Monsanto source	1.12 mM (toxic) (24 h)	Negative	PH, MA, SC, RE	Sivikova and Dianovsky, 2006 (ASB2012-12029)
Chromosome aberration	Human lymphocytes	Glyphosate (96%)	6 mM (not toxic)	Negative	MA, IC, RE	Manas <i>et al.</i> , (2009 ASB2012-11892)
Cytokinesis block micronucleus	Human lymphocytes	Glyphosate (technical, 96%)	580 µg/mL (toxic) (est. 3.43 mM)	Negative (-S9) Positive (+S9)	SC, RE	Mladinic <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-11906)

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
Cytokinesis block micronucleus	Human lymphocytes	Glyphosate (technical, 96%)	580 µg/mL (toxic) (est. 3.43 mM)	Negative (-S9) Positive (+S9)	SC, RE	Mladinic <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-11907)
<i>In Vitro Chromosome Effects— Non Mammalian Systems</i>						
Chromosome aberration	Onion root tip meristem	Roundup formulation (Bulgaria)	1% active ingredient (estimated 4.4-5.9 mM)	Negative	TO, IC, RE	Dimitrov <i>et al.</i> , 2006 (SB2012-11607)
Micronucleus	Onion root tip meristem	Roundup formulation (Bulgaria)	1% active ingredient (estimated 4.4-5.9 mM)	Negative	TO, RE	Dimitrov <i>et al.</i> , 2006 (SB2012-11607)
<i>In Vivo Chromosome Effects—Mammalian Systems</i>						
Bone marrow erythrocyte micronucleus	Mouse	Glyphosate	300 mg/kg i.p. Perzocyd 10 SL formulation	Negative Negative	DL, TO, SC, IM, RE DL, TO, SC, IM, RE	ASB2013-9830, 2000
Bone marrow erythrocyte micronucleus	Mouse	Roundup 69 formulation	2 x 200 mg/kg i.p.	Negative	TO, SC, IE, RE	Coutinho do Nascimento and Grisolia, 2000 (ASB2013-11477)
Bone marrow erythrocyte micronucleus	Mouse	Roundup TM formulation (Monsanto)	2 x 200 mg/kg i.p.	Negative	TO, SC, IE, RE	Grisolia, 2002 (SB2012-11834)
Bone marrow Chromosome aberration	Rabbit	Roundup TM formulation	750 ppm in drinking water	Positive?	DL, PC, TO, SC, IC	Helal and Moussa, 2005 (ASB2012-11841)
Bone marrow Chromosome aberration	Mouse	Herbazed formulation (84% glyphosate)	50 mg/kg i.p. (1,3, 5 days) 100 mg/kg oral (1,7, 14, and 21 days)	Negative Positive	TO, SC, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)
Spermatocyte Chromosome aberration	Mouse	Herbazed formulation (84% glyphosate)	50 mg/kg i.p. (1,3, 5 days) 100 mg/kg oral (1,7, 14, and 21 days)	Negative Positive	TO, SC, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
Bone marrow Chromosome aberration	Mouse	Roundup formulation (Bulgaria)	1080 mg/kg p.o. (1/2 LD50)	Negative	DL, TO, IC, RE	Dimitrov <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11607)
Bone marrow erythrocyte micronucleus	Mouse	Analytical glyphosate (96%)	2 x 200 mg/kg i.p.	Positive	Erythrocytes scored? TO, SC, IC, RE	Manas <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-11892)
Bone marrow Chromosome aberration	Mouse	Roundup TM formulation (Monsanto)	50 mg/kg i.p.	Positive	DL, SC, IC, RE	ASB2012-12005 2009
<i>In Vivo Chromosome Effects—Non-Mammalian Systems</i>						
Erythrocyte micronucleus	Oreochromis niloticus (Tilapia)	Roundup 69	170 mg/kg i.p. (maximum tolerated)	Negative? ^c	TO, RE	Coutinho do Nascimento and Grisolia, 2000 (ASB2013-11477)
Wing spot test	Drosophila	Glyphosate (96%)	10 mM in larval stage	Positive/inconclusive ^b		Kaya <i>et al.</i> , 2000 (ASB2013-9832)
Erythrocyte micronucleus	Tilapia	Roundup TM formulation (Monsanto)	170 mg/kg (abdominal injection)	Positive	TO, RE	Grisolia, 2002 (ASB2012-11834)
Erythrocyte micronucleus	Crassus auratus (goldfish)	Roundup formulation	15 ppm glyphosate in water (2, 4 and 6 days)	Positive	TO, IE, RE	Cavas and Konen, 2007 (ASB2012-11587)
	Prochilodus lineatus (tropical fish)	Roundup TM formulation (75% of 96 h LC50)	10 mg/l (6, 12 and 24 h) in water	Negative	DL, TO, SC, RE	Cavalcante <i>et al.</i> , 2008 (ASB2012-11586)
Erythrocyte micronucleus	Caiman eggs	Roundup [®] Full II formulation	1750 ug/egg	Positive	RE	Poletta <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12002)
Erythrocyte micronucleus	Caiman eggs	Roundup [®] Full II formulation	Sprayed 2x with 100 litres of 3%/ha 30 days apart	Positive	DL, TO, RE	Poletta <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12002)
Micronucleus (and alkaline SCGE)	Fish (Guppy)	Roundup [®] Transorb	5.65 µg/l	Positive		De Souza Filho <i>et al.</i> , 2013 (ASB2014-7617)
<i>In Vitro DNA Damage Mammalian Systems</i>						

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
Alkaline SCGE	GM38 human fibroblasts and HT1090 human	Glyphosate (technical grade)	6.5 mM	Positive	MA, PH, TO, SC, RE	Monroy <i>et al.</i> , 2005 (ASB2012-11910)
Sister chromatid exchange	mouse spleen cells	herbazed formulation	50 µM?	Positive	Concentrations used not clear MA, PH, TO, SC, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)
Sister chromatid exchange	bovine lymphocytes	Glyphosate formulation (62% glyphosate, Monsanto)	1.12 mM (toxic)	Positive	PH, SC, RE	Sivikova and Dianovsky, 2006 (ASB2012-12029)
Alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE, comet)	Hep-2 cells	Glyphosate (analytical, 96%)	7.5 mM (limited by toxicity)	Positive	MA, PH, RE	Manas <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-11892)
Alkaline SCGE	Human lymphocytes	Glyphosate (technical, 96%)	580 µg/ml (toxic) (est. 3.43 mM)	Positive (- S9) Positive (+S9)		Mladinic <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-11906)
SCGE	Human lymphocytes (compared with Tilapia erythrocytes and Tradescantia nuclei)	Glyphosate (96%)	700 µM	Positive (according to authors)	Inconsistent and not clear dose dependent	Alvarez-Moya <i>et al.</i> , 2014 (ASB2014-6902)
SCGE	Human buccal epithelial cells	Glyphosate (95%) and Roundup Ultra Max	200 mg/l	Positive	Higher activity of formulation than pure a. s.	Koller <i>et al.</i> , 2012 (ASB2014-7618)
<i>In Vitro DNA Damage Non-Mammalian Systems</i>						
SOS	E. coli	Roundup BIO formulation	2.5 µg/sample	Positive		Raipulis <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12008)
Alkaline SCGE	Tradescantia flowers and nuclei	Glyphosate (technical, 96%)	700 µM	Positive	PH, SC	Alvarez-Moya <i>et al.</i> , 2011 (ASB2012-11538)
<i>In Vivo DNA Damage Mammalian Systems</i>						
Spermatocytes and bone marrow	Mouse	herbazed formulation (84% glyphosate)	200 mg/kg p.o.	Positive	TO, SC, RE	Amer <i>et al.</i> , 2006 (ASB2012-11539)

End point	Test System	Test Material	Maximum Dose	Result	Comment ^a	Reference
SCGE blood cells, liver cells,	Mouse	Glyphosate (96%) and AMPA	400 mg/kg bw/day Glyphosate or 100 mg/kg bw/day AMPA	Glyphosate and AMPA positive		Manas <i>et al.</i> , 2013 (ASB2014-6909)
<i>In Vivo DNA Damage Non-Mammalian Systems</i>						
Erythrocyte alkaline SCGE	Crassus auratus (goldfish)	Roundup formulation	15 ppm glyphosate in water (2, 4 and 6 days)	Positive	TO, RE	Cavas and Konen, 2007 (ASB2012-11587)
Erythrocyte and gill cell alkaline SCGE	Prochilodus lineatus (tropical fish)	Roundup TM formulation (75% of 96 h LC ₅₀)	10 mg/l (6, 12 and 24 h) in water	Positive	DL, TO, RE	Cavalcante <i>et al.</i> , 2008 (ASB2012-11586)
Erythrocyte alkaline SCGE	Caiman eggs/hatchlings	Roundup® Full II formulation	1750 µg/egg	Positive	RE	Poletta <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12002)
Erythrocyte alkaline SCGE	European eel	Roundup formulation	166 µg/liter	Positive	DL, SC, RE	Guilherme <i>et al.</i> , 2010 (ASB2012-11836)
Erythrocyte alkaline SCGE	Caiman eggs/hatchlings	Roundup® Full II formulation	Sprayed 2x with 100 l of 3%/ha 30 days apart	Positive	DL, RE	Poletta <i>et al.</i> , 2009 (ASB2012-12002)
SCGE blood cells	European eel	Roundup Ultra and Glyphosate and POAE	116 µg/l 35.7µg/118.6 µg/l	positive	No increased effect of glyphosate in combination with POAE	Guilherme <i>et al.</i> , 2012 (ASB2014-7619)
SCGE	Fish (Prochilodus)	Roundup Transorb and Glyphosate	5 mg/l 2.4 mg/l	positive	Inconsistent and not clearly dose dependent	Moreno <i>et al.</i> , 2014 (ASB2014-7522)

^a MA, Mammalian metabolic activation system not used and short exposure not used;

PH, no indication of pH or osmolality control;

DL, less than three dose levels used; PC, no concurrent positive control;

TO, no concurrent measurement of toxicity reported or toxicity not observed for highest dose level;

SC, independent coding of slides for scoring not indicated for visually scored slides;

IC, less than 200 cells scored per treatment or less than 100 metaphases scored per animal for chromosome aberrations;

IE, less than 2000 erythrocytes scored per animal;

RE, results not reported separately for replicate cultures or individual animals;

^b Positive for small wing spots only in one cross. Negative or inconclusive for all spot categories for three other crosses.

^c Statistically significant increase in micronucleated PCE frequency only at mid dose level but overall result judged negative.