



CYPERMETHRINE : LA COMMISSION EUROPEENNE IGNORE SA PROPRE REGLEMENTATION

Une substance qui a contaminé l'ensemble de la population, laissée sur le marché malgré ses propriétés PE.

Rappelons d'abord que la Cyperméthrine (CYP) fait partie d'une grande famille, celle des pyréthriinoïdes. Ce sont des analogues synthétiques des pyréthrines, substances chimiques naturelles présentes dans certaines espèces de chrysanthème, ce qui leur donne une image rassurante. Introduits sur le marché à partir du milieu des années 1970, ils ont une utilisation très large aussi bien domestique que professionnelle. Ils constituent aujourd'hui la famille d'insecticides la plus utilisée, en milieu agricole, pour la protection du bois, ou comme insecticides domestiques et comme antiparasitaire humain (par exemple la perméthrine dans le traitement de la gale). Ce sont des insecticides à spectre très large, utilisés contre des cibles très variées : insectes volants, rampants, puces, tiques, poux, gale, pucerons, cochenille, mouches des fruits et légumes, vers et insectes xylophages. Alors que 70 % de la biomasse des insectes volants a disparu en une trentaine d'années, cette énumération devrait suffire à nous alerter. **Pendant dans ce travail nous allons nous focaliser sur un autre aspect, la perturbation endocrinienne.**

Pourquoi s'intéresser à la famille des pyréthriinoïdes, et en particulier à la Cyperméthrine ?

Parce que, conséquence logique de si larges utilisations, la contamination de la population française et européenne est massive et connue de longue date :

- **100 % des femmes enceintes de la cohorte Elfe** en France présentent dans leurs urines des résidus quantifiés de Pyréthriinoïdes ⁽¹⁾. Précisons qu'on ne peut rattacher ces métabolites urinaires à un pyréthriinoïde en particulier mais qu'ils sont communs à plusieurs (sauf le 4F-PBA spécifique de la cyfluthrine)

¹ IMPRÉGNATION DES FEMMES ENCEINTES PAR LES POLLUANTS DE L'ENVIRONNEMENT EN FRANCE EN 2011. Volet périnatal du programme national

« Les métabolites de pyréthriinoïdes ont été mesurés à des concentrations quantifiables chez l'ensemble des femmes enceintes ayant fait l'objet d'un dosage, hormis le 4-F-PBA ».

- en décembre 2021, les données de la cohorte ESTEBAN (2), enfoncent le clou :

« Dans Esteban, les concentrations en pyréthriinoïdes chez les enfants étaient plus élevées que celles mesurées chez les adultes. Tous les métabolites hormis le 4-F-PBA étaient quantifiés à 99% ou plus dans la population des adultes ou dans celle des enfants »

- même s'il existe des différences entre pays on retrouve des résultats comparables dans les études étrangères. Pour l'ensemble des études concernant le 3-PBA, le métabolite le plus commun, les niveaux retrouvés chez les enfants en France étaient supérieurs à ceux mesurés dans les pays nord-américains. Pour un autre métabolite comme le DBCA (le cis DBCA est spécifique de la deltaméthrine), les concentrations mesurées dans l'étude Esteban étaient supérieures à celles observées dans les autres études et similaires à celles de l'étude espagnole.

Parce que les pyréthriinoïdes ont des effets neurotoxiques reconnus chez l'homme, et en particulier chez les enfants :

- Baisse des performances cognitives en cas d'exposition pendant l'enfance : une augmentation des taux urinaires de deux métabolites des pyréthriinoïdes (3 PBA et cis-DBCA) chez les enfants est associée à une baisse significative de leurs performances cognitives, en particulier de la compréhension verbale et de la mémoire de travail. Cette étude (3) a été réalisée sur près de 300 couples mère-enfant de la cohorte PELAGIE (Bretagne), L'exposition aux insecticides pyréthriinoïdes a été estimée par le dosage de cinq métabolites (3-PBA, 4-F-PBA, cis-DCCA, trans-DCCA et cis-DBCA) dans les urines de la mère (recueillies entre la 6ème et la 19ème semaine de grossesse) et de l'enfant (recueillies à son 6ème anniversaire).

« Les résultats montrent qu'une augmentation des taux urinaires chez l'enfant de deux métabolites (3 PBA et cis-DBCA) est associée à une baisse significative des performances cognitives, alors qu'aucune association n'est observée pour les trois autres métabolites (4-F-PBA, cis-DCCA, trans-DCCA). En ce qui concerne les concentrations de métabolites durant la grossesse aucun lien n'est mis en évidence avec les scores neuro-cognitifs ».

NB : Les fonctions cognitives sont les capacités du cerveau qui permettent notamment de communiquer, de percevoir son environnement, de se concentrer, de se souvenir d'un événement ou d'accumuler des connaissances.

² **imprégnation de la population française par les pyréthriinoïdes**

Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016, Décembre 2021

³ Viel JF, Warembourg C, Le Maner-Idrissi G, Lacroix A, Limon G, Rouget F, Monfort C, Durand G, Cordier S, Chevrier C.

Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. Environ Int. 2015 Sep;82:69-75. doi: 10.1016/j.envint.2015.05.009. Epub 2015 Jun 5. PMID: 26057254.

- Troubles Internalisés du Développement (tels que l'anxiété) en cas d'exposition pendant la grossesse : en 2021 la seconde expertise de l'Inserm consacrée aux liens entre pesticides et santé humaine, a considéré que l'exposition aux pyréthriinoïdes pendant la grossesse était associée chez l'enfant, avec un niveau de preuve fort, aux troubles internalisés (type anxiété). Il existe également un lien avec l'hyperactivité en cas d'exposition pendant la petite enfance ⁽⁴⁾.

« Les nouvelles études sur les pyréthriinoïdes mettent en évidence un lien entre l'exposition pendant la grossesse et l'augmentation des troubles du comportement de type internalisé tels que l'anxiété chez les enfants. Les données expérimentales sur des rongeurs suggèrent une hyperperméabilité de la barrière hémato-encéphalique aux pyréthriinoïdes aux stades les plus précoces du développement, confortant la plausibilité biologique de ce lien »

Parce qu'une curieuse décision de la CE a retenu notre attention :

La CE vient en effet de renouveler l'autorisation de la Cyperméthrine (5), tout en précisant tout à fait en fin de l'annexe 1 :

« En ce qui concerne, à l'annexe II du règlement (CE) no 1107/2009, les points 3.6.5 et 3.8.2 tels que modifiés par le règlement (UE) 2018/605, une évaluation actualisée des informations déjà soumises et, le cas échéant, des informations supplémentaires permettant de confirmer l'absence d'activité de la substance en tant que perturbateur endocrinien sont soumises au plus tard le 15 décembre 2023 »

Traduisons : les points 3.6.5 et 3.8.2 définissent dans le règlement 1107/2009 ce qu'il est convenu d'appeler des critères d'exclusion : quand une substance est considérée « comme ayant des effets perturbateurs endocriniens pouvant être néfastes pour l'homme » ou « pour les organismes non cibles », elle ne peut être approuvée. Ces critères ont été précisés dans un règlement de 2018. La CE vient pourtant de considérer, ainsi que les Etats qui ont voté ce renouvellement d'autorisation, que le respect d'un critère d'exclusion (la fourniture en temps et heure de données sur la perturbation endocrinienne potentielle) pouvait attendre, pire qu'on allait s'en passer. Car qui viendra vérifier en décembre que la Commission a bien reçu ces informations complémentaires ? Et la Commission les communiquera-t-elle ? Enfin si ces informations montraient des effets PE, conduiraient-elles à une remise en cause de la décision du 24 novembre 2021 ? On peut en douter car dans la décision adoptée ⁽⁵⁾ la date de fin de l'approbation est fixée à 2029, comme si elle était acquise, ce qui est un comble ou une erreur.

Nous avons donc réalisé un examen des données de la littérature internationale afin d'évaluer le caractère perturbateur endocrinien de la Cyperméthrine. En adoptant le plan réglementaire : mise en évidence d'un effet adverse sur un organisme ou sa descendance,

⁴ Pesticides et effets sur la santé, nouvelles données. Expertise collective Inserm, 2021.

⁵ RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2021/2049 DE LA COMMISSION du 24 novembre 2021 renouvelant l'approbation de la substance active «cyperméthrine» comme substance dont la substitution est envisagée, conformément au règlement (CE) no 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, et modifiant l'annexe du règlement d'exécution (UE) no 540/2011 de la Commission .

d'un effet endocrinien, d'un lien plausible entre l'activité endocrinienne et l'effet adverse (définissant les PE certains et présumés). La récente modification du CLP introduit les PE suspectés « lorsque des informations soulèvent de sérieux doutes quant à la pertinence des effets indésirables pour l'homme, une classification dans la catégorie 2 peut s'avérer plus appropriée » (annexe 1, 19.12.2022, delegated regulation amending Regulation (EC) No 1272/2008 as regards hazard classes and criteria for the classification, labelling and packaging of substances and mixtures) : mais ce texte n'entrera en vigueur qu'en 2025.

Avant de considérer les données scientifiques sur l'aspect PE, il faut préciser deux éléments très importants :

- **les Pyréthriinoïdes franchissent la barrière placentaire** : ils sont en effet retrouvés dans le sang du cordon ombilical – Silver, 2016 ⁽⁶⁾ - et dans le méconium - Berton, 2014 ⁽⁷⁾ ; comme le confirme cette étude de 2020 où la CYP a été testée sur un modèle de perfusion placentaire, Mathisen 2020 ⁽⁸⁾.

- **les PYR franchissent la barrière hémato-encéphalique** (cf expertise Inserm ⁽⁹⁾)

Résumé de nos conclusions :

Sur le plan scientifique les données de la littérature internationale sont fournies concernant les Pyréthriinoïdes, mais aussi la Cyperméthrine.

- Elles permettent d'affirmer que la CYP est un PE impactant en particulier deux axes : l'axe thyroïdien et l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique.

- Dans ces deux cas des effets cliniques (Troubles du neuro-développement (TND), perturbation de la puberté et effets sur l'appareil reproducteur mâle) sont documentés (avec un niveau de preuve moindre pour la perturbation de la puberté)

- des modes d'action endocriniens sont établis, avec un niveau de preuve inférieur concernant l'axe thyroïdien.

- la plausibilité biologique du lien entre ces modes d'action endocriniens et les effets observés est forte en raison, dans l'un et l'autre cas, de la mise en évidence de mécanismes

⁶ Silver, M.K.; Shao, J.; Chen, M.; Xia, Y.; Lozoff, B.; Meeker, J.D. **Distribution and Predictors of Pesticides in the Umbilical Cord Blood of Chinese Newborns.** *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010094>

⁷ Berton T, Mayhoub F, Chardon K, Duca RC, Lestremau F, Bach V, Tack K. **Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: application and characterisation of foetal exposure in France.** *Environ Res.* 2014 Jul;132:311-20. doi: 10.1016/j.envres.2014.03.034. Epub 2014 May 14. PMID: 24834827

⁸ Mathiesen L, Mørck TA, Poulsen MS, Nielsen JKS, Mose T, Long M, Bonefeld-Jørgensen E, Bossi R, Knudsen LE. **Placental transfer of pesticides studied in human placental perfusion.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2020 Dec;127(6):505-515. doi: 10.1111/bcpt.13456. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32558230; PMCID: PMC7689789.

⁹ **Pesticides et effets sur la santé, nouvelles données.** Expertise collective Inserm, 2021.

moléculaires initiateurs (MIE) ou d'évènements clés (KE) reconnus par le monde scientifique et les experts de l'OCDE.

Il est donc parfaitement incompréhensible que la question du caractère PE de la CYP ait été traitée comme une question annexe. La CE doit avoir la mémoire courte car la CYP fut classée PE 1, c'est à dire PE certain, dans l'option 3 de la CE (Screening of available evidence on chemical substances for the identification of endocrine disruptors according to different options in the context of an Impact Assessment, 2015), classement repris par l'Anses dans le projet DeduCt. ⁽¹⁰⁾

Sur le plan politique : nous demandons à nos représentants (députés nationaux et européens), aux ministères de la santé, de l'écologie d'intervenir pour que cette question soit débattue au grand jour et pas seulement dans les cercles d'experts européens. Nous leur demandons particulièrement :

- 1) de se tourner vers la CJUE afin de déterminer si le **RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2021/2049 DE LA COMMISSION du 24 novembre 2021 a une valeur légale**, en particulier le fait d'accorder un renouvellement d'AMM en remettant à une date ultérieure l'examen du respect d'un critère d'exclusion. Comme l'a fait il y a quelques mois l'association PAN Europe
- 2) d'enclencher toute procédure qui leur paraîtra pertinente afin d'obtenir le respect du règlement 11/07/2009, (évaluation du caractère PE comme critère d'exclusion, et prise en compte de la littérature internationale)
- 3) d'enclencher une procédure de retrait du marché français des produits contenant de la Cyperméthrine.

PLAN

1 La CYP est-elle un perturbateur de l'axe thyroïdien ?

1.1 Effets adverses

1.1.1 constatés in vivo

1.1.2 Effets adverses constatés chez l'homme :

1.1 .2.1 effets adverses portant sur les HT ou la TSH. Cohortes Costa-Ricaine, Japonaise, Sud Africaine (Chevrier), Hwang

1 .1.2.2 association exposition aux PYR et TND : Expertise Inserm 2021, Revue d'Andersen et col, 2022

1.2 Effets endocriniens :

1.2.1 sur la synthèse et le transport des HT

¹⁰ <https://www.anses.fr/fr/system/files/REACH2019SA0179Ra-1.pdf>

1.2.2 sur les récepteurs thyroïdiens (RT)

1.2.3 sur l'expression de gènes impliqués dans le système thyroïdien

1.3. Plausibilité d'un lien entre les effets endocriniens et les TND

2 La CYP est-elle un perturbateur de l'axe Hypothalamo-pituito-gonadique ?

2.1 Effets adverses

2.1.1 Sur l'appareil reproducteur mâle

2.1.1.1 chez l'animal in vivo

2.1.1.2 : chez l'homme

2.1.2 Effets sur l'avance ou le retard de la puberté :

2.1.2.1 chez l'animal In vivo

2.1.2.2 chez l'homme

2.2 Effets endocriniens sur l'axe HPG

2.2.1 modifications des concentrations hormonales : testostérone, FSH et LH

2.2.2 action sur les cellules de Sertoli et la spermatogénèse

2.2.3 Sur les récepteurs : la CYP est un antagoniste du récepteur des androgènes (RA)

2.2.4 Sur l'expression de différents gènes

2.3. Plausibilité d'un lien entre les effets endocriniens constatés sur l'axe HPG et effets adverses

3 Conclusion

Références Bibliographiques

Annexe 1

ANALYSE A PARTIR DE DONNEES PROVENANT DE LA LITTERATURE SCIENTIFIQUE

Remarque préliminaire :

La cyperméthrine est constituée de 8 isomères (4 isomères cis et 4 trans), et commercialisée dans différents ratios cis/trans. Les 4 principaux mélanges d'isomères sont l'alpha-cyperméthrine (n° CAS 67375-30-8), la bêta-cyperméthrine (n° CAS 65731-84-2), la thétacyperméthrine (n° CAS 71697-59-1 et 65732-07-2) et la zêta-cyperméthrine (n° CAS 97955-44-7). Malheureusement rares sont les études précisant le type de CYP utilisée.

1 La CYP est-elle un perturbateur de l'axe thyroïdien ?

Compte-tenu du contexte épidémiologique (contamination de la presque totalité des femmes enceintes et des enfants), et du fait que dans le cerveau en développement, de nombreux processus nécessitent une régulation des réseaux de gènes par les HT : division cellulaire, différenciation de type de cellules neuronales spécifiques, synaptogénèse, plasticité neuronale ⁽¹¹⁾, il est logique de rechercher un lien entre perturbation de l'axe thyroïdien et troubles du neurodéveloppement (TND). Nous allons donc centrer notre approche sur les TND.

Le terme « troubles du neurodéveloppement » renvoie cependant à deux conceptions :

- **celle du Processus de développement neurologique**, qui décrit les événements biologiques débutant chez l'embryon, leur séquence chronologique, le rôle particulier des hormones dans l'expression génétique et la prolifération, la migration cellulaire, la synaptogénèse, la myélinisation, bref un ensemble d'évènements qui vont parfois se poursuivre jusqu'à l'âge adulte.

- **celle clinique non plus du neurodéveloppement mais des troubles neuro-développementaux définis dans le DSM V et la CIM 11** : handicap intellectuel, troubles de la communication (comprenant les difficultés de parole et langage), troubles du spectre de l'autisme (TSA), déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH), troubles spécifiques des apprentissages, troubles moteurs, dont les tics, et les « autres troubles neuro-développementaux spécifiés et non spécifiés ». Cette notion est critiquée à la fois parce qu'elle serait trop vague (les TSA représentent par exemple une grande hétérogénéité clinique) et parce que certains y voient une explication réductrice avec *« la mise en avant d'un processus ou mécanisme d'action commun principalement neurobiologique ou neurologique, alors que le développement est sous la dépendance de facteurs divers (tant innés qu'acquis) toujours étroitement imbriqués »*, Deleque, 2020 ⁽¹²⁾. Si l'approche DSM est critiquable car souvent éloignée de toute approche psychopathologique voire

¹¹ Barbara DEMENEIX, le cerveau endommagé. Odile JACOB, 2016.

¹² Les « troubles neurodéveloppementaux », Anne Deleque Pédoopsychiatre, PRATIQUES, Janvier 2020.

psychogénique, dans une optique épidémiologique nous nous référerons à ces entités car ce sont celles qui sont utilisées dans la littérature internationale.

Les données *in vivo*, *in vitro* renverront au « processus ».

Les données épidémiologiques humaines porteront sur des entités cliniques appartenant aux troubles neuro-développementaux avec les limites évoquées ci-dessus.

1.1 Effets adverses

1.1.1 constatés *in vivo* chez l'animal :

Des dysfonctionnements cérébraux durables après une exposition prénatale ou postnatale précoce ont été démontrés dans des modèles animaux pour les PYR⁽¹³⁾. Concernant spécifiquement la CYP on retrouve plusieurs études récentes :

- Laugeray 2017⁽¹⁴⁾ chez des souris femelles exposées à de faibles doses de Cyperméthrine (5 et 20 mg/kg body weight) pendant la gestation jusqu'au J 15 post natal. Les analyses post natales révèlent que l'exposition périnatale à la CYP perturbe le développement moteur. A distance la progéniture exposée au CYP exprimait des comportements inadaptés et une sociabilité anormale. Les analyses transcriptomiques effectuées dans le cerveau de la progéniture à la fin de l'exposition ont mis en évidence un dysfonctionnement mitochondrial. Mais aussi des gènes impliqués dans le maintien de la protéostase, suggérant que des altérations de la biogénèse, du repliement, de la dégradation des protéines peuvent contribuer de manière significative aux TND liés aux CYP.

- Ha, 2021⁽¹⁵⁾ Dans cette étude portant sur des rats et des cellules thyroïdiennes de rats, la Béta-CYP stimulait la biosynthèse de la TH, comme le montre l'augmentation des taux plasmatiques de TT4, FT4, FT3 et TSH. De plus la Béta CYP a également perturbé la bio transformation et le transport des TH en induisant DIO1 et en inhibant DIO3 dans les thyroïdes et les expressions de TTR dans le foie.

- Guo, 2018⁽¹⁶⁾ : de faibles doses de CYP durant la gestation chez la souris entraînent une réduction de la prolifération neuronale, de la maturation et de la différenciation cellulaire, et augmentent l'apoptose dans le cortex cérébral de la descendance.

¹³ Abreu-Villaça Y, Levin ED. **Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides.** Environ Int. 2017 Feb;99:55-77. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.019. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27908457; PMCID: PMC5285268.

¹⁴ Anthony Laugeray, Ameziane Herzine, Olivier Perche, Olivier Richard, Céline Montecot-Dubourg, Arnaud Menuet, Séverine Mazaud-Guittot, Laurianne Lesné, Bernard Jegou, Stéphane Mortaud ***In utero* and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice—An ethological and transcriptomic study.** Plos one 2017

¹⁵ Ha M, Huang X, Li L, Lu D, Liu C. **PKC α mediated by the PI3K/Akt-FOXO1 cascade facilitates cypermethrin-induced hyperthyroidism.** Sci Total Environ. 2021 Feb 25;757:143727. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143727. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33250241.

¹⁶ Guo J, Xu J, Zhang J, An L. **Alteration of mice cerebral cortex development after prenatal exposure to cypermethrin and deltamethrin.** Toxicol Lett. 2018 May 1;287:1-9. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.01.019. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29407790

1.1.2 données humaines

1.1.2.1 données humaines sur la perturbation des HT et/ou TSH

- un suivi d'une cohorte de 400 femmes enceintes au Costa-Rica (seulement 8 % travaillait dans l'agriculture pendant leur grossesse contre 60 % de leurs partenaires), Corrales Vargas 2021 ⁽¹⁷⁾, montre, selon ses auteurs, que les plus fortes concentrations de métabolites urinaires de pyréthrinoïdes chez les femmes étaient associées à une baisse de la TSH. Cependant ce résultat repose seulement sur une quarantaine de femmes présentant des valeurs très élevées de 3-PBA (> 2,12 µg/l) sans rapport avec l'exposition de la population générale. Pour les concentrations urinaires de 3-PBA plus basses, compte-tenu de l'intervalle de confiance large il semble impossible de conclure.

- une autre cohorte, japonaise cette fois, Zhang 2013 ⁽¹⁸⁾ n'avait pas retrouvé d'association avec une baisse ou une hausse de la TSH, ni avec la T4L. Les auteurs de l'étude costaricaine émettaient l'hypothèse que cela serait dû aux concentrations retrouvées : médiane de 0,36 µg/l dans l'étude de Zhang contre 0,69 µg/l dans leur étude (sans précision sur le métabolite). Ces données sont à rapprocher de celles de la cohorte ESTEBAN en France qui montre pour les enfants des concentrations moyennes en 3-PBA, Br2CA, CisCl2CA respectivement de **1,10 µg. L-1**, 1,09 µg. L-1, 0,32 µg. L-1 (0,33 µg. g-1 de créatinine), donc largement supérieures ! ⁽¹⁹⁾ L'étude de Zang fait partie de la revue d'Andersen que nous aborderons plus loin.

- depuis l'étude de Hu, 2019 ⁽²⁰⁾ a montré une association chez 374 femmes enceintes [recrutées lors de l'admission pour l'accouchement (troisième trimestre de grossesse) dans un hôpital local du Shandong, en Chine, de décembre 2011 à décembre 2013 dans leur 3ème trimestre de grossesse] entre la concentration de 3-PBA dans leurs urines et une baisse de la T3 libre. (La fréquence de détection du 3PBA était de 90,4 %, avec une concentration médiane de 1,14 µg/g de créatinine).

Cette étude permet d'aborder un point important car on sait que « *les effets des CDT (Thyroid disrupting chemicals) dans l'organisme en développement sont indépendants de la*

¹⁷ Corrales Vargas A, Peñaloza Castañeda J, Rietz Liljedahl E, Mora AM, Menezes-Filho JA, Smith DR, Mergler D, Reich B, Giffin A, Hoppin JA, Lindh CH, van Wendel de Joode B. **Exposure to common-use pesticides, manganese, lead, and thyroid function among pregnant women from the Infants' Environmental Health (ISA) study, Costa Rica.** Sci Total Environ. 2022 Mar 1;810:151288. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151288. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34756903; PMCID: PMC9162492.

¹⁸ Zhang, J., Hisada, A., Yoshinaga, J., Shiraishi, H., Shimodaira, K., Okai, T., Noda, Y., Shirakawa, M., Kato, N., 2013. **Exposure to pyrethroids insecticides and serum levels of thyroid-related measures in pregnant women.** Environ. Res. 127, 16–21

¹⁹ **imprégnation de la population française par les pyréthrinoïdes** Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016, Décembre 2021.

²⁰ Hu Y, Zhang Z, Qin K, Zhang Y, Pan R, Wang Y, Shi R, Gao Y, Tian Y. **Environmental pyrethroid exposure and thyroid hormones of pregnant women in Shandong, China.** Chemosphere. 2019 Nov;234:815-821. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.098. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31247491.

TSH et résultent plutôt d'une diminution des niveaux tissulaires de T4 et de T3 »⁽²¹⁾. Des données humaines montrent le risque de perturbations subtiles de ces taux hormonaux pendant la grossesse, c'est à dire aux limites des valeurs physiologiques de l'adulte (64). Dans cette étude de cohorte prospective (intégrée à l'étude Generation R (Rotterdam, Pays-Bas), portant sur 3839 paires mères/enfant avec des IRM disponibles pour 646 enfants) et après exclusion des dysthyroïdies manifestes, les concentrations maternelles de thyroxine libre montraient une association en forme de U inversé avec le QI de l'enfant ($p=0.0044$), le volume de matière grise de l'enfant ($p=0.0062$) et le volume du cortex ($p=0.0011$). En revanche pas d'association avec la TSH.

- l'étude de Chevrier, 2019 (19), qui porte sur la cohorte VHEMBE (Venda Health Examination of Mothers, Babies and their Environment) montre que l'exposition prénatale aux insecticides pyréthrinoïdes est associée à des modifications de concentration des hormones thyroïdiennes néonatales compatibles avec l'hypothyroïdie/hypothyroxinémie. Les concentrations des métabolites urinaires des pyréthrinoïdes ont été mesurés à partir d'échantillons périnataux de 717 femmes participant à la cohorte (VHEMBE). La thyroxine totale (T4) et la thyroïdostimuline (TSH) ont été collectées via un prélèvement au talon. Tous les métabolites des pyréthrinoïdes étaient positivement associés à la TSH ; (C'est avec le trans-DCCA et le 3-PBA que l'on retrouve les associations les plus fortes avec l'augmentation de la TSH – avec 12.3% (95%CI=3.0, 23.3) et 14.0 % (95%CI=0.5,30.2) d'augmentation pour chaque augmentation de 10 fois la concentration du biomarqueur, respectivement - et de façon significative chez les filles). Les associations entre les métabolites des pyréthrinoïdes et la T4 étaient généralement négatives mais non significatives. Cependant, les associations avec T4 ont été sensiblement plus forte chez les enfants de ménages pauvres selon ses auteurs pour tous les métabolites des pyréthrinoïdes, et plus particulièrement pour cis-DCCA ($\beta=-0,39$; IC 95 %=-0,74, -0,06), trans-DCCA ($\beta= -0,28$; 95 % IC = -0,50, 0,00) et 3-PBA ($\beta = -0,33$; 95 % IC = -0,70, 0,05) avec p- valeurs inférieures à 0,04. (c'est à dire 3 métabolites de la CYP). Attention : ici les taux hormonaux sont mesurés chez les nourrissons : la tendance à la hausse de TSH est en faveur d'une hypothyroïdie ou hypothyroxinémie (alors que dans l'étude costa-ricaine ils étaient mesurés chez les femmes enceintes)

- enfin une étude coréenne, Hwang 2019 (22), a recherché sur un échantillon jugé représentatif de la population coréenne (recruté au sein de la Korean National Environmental Health Survey, 2012-2014), s'il existait un lien entre le taux de 3-PBA urinaire et une éventuelle perturbation des HT et de la TSH. Les taux de 3-PBA sont élevés (seraient 3 fois plus élevés que ceux retrouvés au Canada et aux USA). Ils sont associés à une baisse des HT (T4 et T3 chez l'homme, mais seulement T4 chez la femme) ; l'association avec la baisse de T3 est significative chez les adultes dans la moitié inférieure des concentrations de 3-PBA.

- **Au total** : il est possible que des expositions fortes aux PYR (d'ordre professionnels) induisent une hyperthyroïdie ⁽²³⁾. Mais dans des gammes de concentrations correspondant à

²¹) Kevin M. Crofton, **Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures**. International Journal of andrology, 2008. *PhD,

²² Hwang M, Lee Y, Choi K, Park C. **Urinary 3-phenoxybenzoic acid levels and the association with thyroid hormones in adults: Korean National Environmental Health Survey 2012-2014**. Sci Total Environ. 2019 Dec 15;696:133920. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133920. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31446285.

²³ Corrales Vargas A, Peñaloza Castañeda J, Rietz Liljedahl E, Mora AM, Menezes-Filho JA, Smith DR, Mergler D, Reich B, Giffin A, Hoppin JA, Lindh CH, van Wendel de Joode B. **Exposure to common-use pesticides, manganese, lead, and thyroid**

l'exposition de la population générale une étude japonaise ne montre rien (la médiane de concentration est cependant largement inférieure à celles retrouvées chez l'enfant dans l'étude Esteban), quand deux autres (Chevrier portant sur des nourrissons exposés pendant la gestation, et Hwang en population générale) vont dans le sens d'une hypothyroïdie.

Aucune des études qui viennent d'être citées n'a recherché de TND associés.

1.1.2.2 données humaines concernant l'association exposition aux PYR et TND :

- l'expertise Inserm 2021⁽²⁴⁾ :

L'expertise collective de l'INSERM a caractérisé les liens entre l'exposition professionnelle ou environnementale des mères pendant la grossesse et les troubles de développement neuropsychologique et moteur de l'enfant. Malgré la difficulté de cibler des substances actives en particulier, cette expertise collective établit un niveau de présomption fort avec les insecticides organophosphorés (classe d'insecticide spécifique) et les pyréthrinoïdes.

Les troubles associés aux pyréthrinoïdes décrits par l'expertise collective de l'INSERM sont les suivants :

- Etude de l'Université Columbia sur une cohorte new-yorkaise : diminution des performances cognitives globales à 3 ans en lien avec les niveaux de butoxyde de pipéronyle mesurés dans l'air pendant la grossesse (Horton et al, 2011)⁽²⁵⁾
- Etude sur une autre cohorte new-yorkaise de l'hôpital Mount Sinai : augmentation de troubles du comportement, de type externalisé et internalisé, de l'enfant entre 4 et 9 ans en lien avec l'exposition prénatale aux pyréthrinoïdes (Furlong et al, 2017)⁽²⁶⁾
- Etude sur la cohorte de Central Ohio : diminution des performances cognitives globales à l'âge de 3 mois en association avec les niveaux urinaires de métabolites de pyréthrinoïdes

function among pregnant women from the Infants' Environmental Health (ISA) study, Costa Rica. Sci Total Environ. 2022 Mar 1;810:151288. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151288. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34756903; PMCID: PMC9162492.

²⁴ <https://www.inserm.fr/expertise-collective/pesticides-et-sante-nouvelles-donnees-2021/>

²⁵ Horton et al. (2011), **Impact of Prenatal Exposure to Piperonyl Butoxide and Permethrin on 36-Month Neurodevelopment**

²⁶ Furlong et al. (2017) **Prenatal Exposure to Pyrethroid Pesticides and Childhood Behavior and Executive Functioning**

mesurés pendant le 3e trimestre de grossesse, en tenant compte de ces mêmes métabolites mesurés dans les urines des enfants de 3 mois (Fluegge et al, 2016⁽²⁷⁾)

- Etude sur la cohorte française PELAGIE (regroupant des femmes enceintes de Bretagne) : diminution des scores de compréhension verbale et de mémoire de travail des enfants à 6 ans en association avec les concentrations urinaires en 3-PBA et en cis-DBCA mesurées dans les urines des enfants le matin du jour de l'évaluation neuropsychologique (Viel et al, 2015⁽⁷⁰⁾). Cette étude a également montré qu'un risque augmenté de troubles élevés de comportement internalisé était associé aux concentrations urinaires prénatales de cis-DCCA

- Etude faite au Danemark sur la cohorte Odense Child : augmentation des troubles de déficit d'attention et d'hyperactivité (TDAH) chez l'enfant à 2,5 ans en lien avec les concentrations urinaires maternelles de 3-PBA (Dalsager et al, 2019 ⁽²⁸⁾)

- Etude sur la cohorte mexicaine ELEMENT : diminution des performances cognitives globales à 24 mois, mais pas à 36 mois, en lien avec les niveaux urinaires de 3-PBA mesurés pendant la grossesse (Watkins et al, 2016 ⁽²⁹⁾)

- Etude sur une cohorte mères-enfant VHEMBE conduite en Afrique du Sud : diminution du score de développement socio-émotionnel de l'enfant à 1 an associée aux concentrations maternelles urinaires de cis-DCCA, trans DCCA et 3-PBA ; ainsi qu'une diminution du score BSID de développement du langage à l'âge de 2 ans associée à la concentration en cis-DBCA (Eskenazi et al, 2018 ⁽³⁰⁾)

- Etude sur une cohorte mères-enfants japonaise : meilleur développement de l'enfant à 18 mois en lien avec les concentrations urinaires de 3-PBA mesurées au 1er trimestre de grossesse (Hisada et al, 2017 ⁽³¹⁾)

- Résultats de trois études transversales : i) augmentation des troubles comportementaux en lien avec leurs concentrations urinaires de cis-DCCA (Oulhote et al, 2013 ⁽⁷⁵⁾ ; ii) aucune association avec les troubles de comportement externalisés (Quiros-Alcala et al, 2014 ⁽³²⁾ ; iii) augmentation du risque de déficit attentionnel avec/sans hyperactivité, plus prononcée chez les garçons, en lien avec les concentrations urinaires de 3-PBA (Wagner-Schuman et al, 2015 ⁽³³⁾)

²⁷ Fluegge et al. (2016) **Effects of Simultaneous Prenatal Exposures to Organophosphate and Synthetic Pyrethroid Insecticides on Infant Neurodevelopment at Three Months of Age**

²⁸ **Hyperactivity Disorder (ADHD) Symptoms in 2-4-Year-Old Children from the Odense Child Cohort**

²⁹ Watkins et al. (2016) **Urinary 3-Phenoxybenzoic Acid (3-PBA) Levels among Pregnant Women in Mexico City: Distribution and Relationships with Child Neurodevelopment**

³⁰ Eskenazi et al. (2018) **Prenatal Exposure to DDT and Pyrethroids for Malaria Control and Child Neurodevelopment: The VHEMBE Cohort, South Africa**

³¹ Hisada et al. (2017) **Maternal exposure to pyrethroid insecticides during pregnancy and infant development at 18 months of age**

³² Quiros-Alcala et al. (2014) **Pyrethroid Pesticide Exposure and Parental Report of Learning Disability and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in U.S. Children: NHANES 1999-2002**

³³ Wagner-Schuman et al. (2015) **Association of Pyrethroid Pesticide Exposure with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a Nationally Representative Sample of U.S. Children**

l'INSERM conclut donc : « Une concordance de résultats entre les études, quel que soit le contexte, est observée et suggère **avec une présomption forte *une augmentation des troubles du comportement de l'enfant, notamment de type internalisé** (par exemple anxiété), en lien avec l'exposition prénatale aux insecticides pyréthroïdes. »

En revanche l'Inserm conclut à un niveau de présomption faible concernant l'altération des capacités motrices et cognitives par les pyréthroïdes.

* La présomption est forte s'il existe une méta-analyse de bonne qualité qui montre une association statistiquement significative, ou plusieurs études de bonne qualité et d'équipes différentes qui montrent des associations statistiquement significatives.

** La présomption est considérée faible si les études ne sont pas de qualité suffisante ou sont incohérentes entre elles ou n'ont pas la puissance statistique suffisante pour permettre de conclure à l'existence d'une association.

- la revue d'Andersen 2022 ⁽³⁴⁾ a eu pour objectif de répondre à la question : l'exposition aux PYR des fœtus et/ou des enfants affecte-elle le neurodéveloppement humain ? Elle associe une revue des études épidémiologiques avec un examen des mécanismes d'action pouvant expliquer le lien entre perturbation de l'axe thyroïdien et TND.

25 publications ont rempli-les critères de sélection (par ex mesures de l'exposition pendant la grossesse ou pendant l'enfance, technique de mesure, données concernant les conditions économiques et sociales des parents, scores d'intelligence des enfants...) et les auteurs ont estimé et classé le niveau de biais pour chacune des études. Elles ont été publiées entre 2011 et 2021 et concernent 12 pays différents. Une méta-analyse n'a pas été possible du fait des différences de techniques de mesure, de l'âge des enfants lors des examens, des méthodes de tests utilisées pour la mise en évidence des TND. Dans cette revue :

- **17 études concernent l'exposition prénatale et le ND (dont 15 études de cohorte) : 12 rapportent une association entre exposition aux PYR et TND.** «Overall, we concluded that the strength of evidence for an association between prenatal pyrethroid exposure and adverse neurodevelopment **was sufficient**. This rating was based on an overall moderate quality of evidence across the studies, consistent adverse associations between pyrethroid exposure and neurobehavioral outcomes including evidence from large, well-conducted studies, and some evidence for decrement in cognitive function with increasing prenatal pyrethroid exposure although not consistent over all studies.

Donc troubles cognitifs et comportementaux.

³⁴ Andersen HR, David A, Freire C, Fernández MF, D'Cruz SC, Reina-Pérez I, Fini JB, Blaha L. **Pyrethroids and developmental neurotoxicity - A critical review of epidemiological studies and supporting mechanistic evidence.** Environ Res. 2022 Nov;214(Pt 2):113935. doi: 10.1016/j.envres.2022.113935. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35870501.

« We assess the confidence to be reasonable and find it unlikely that the conclusion will be strongly affected by the results of future studies »

- **10 études portent sur l'exposition post natale** : toutes sont des études transversales. 80 % montrent des associations significatives entre l'exposition aux PYR pendant l'enfance et TND. Compte-tenu du design des études « we assessed the overall strength of evidence to be **limited** for an association between childhood pyrethroid exposure and impaired neurodevelopment »

1.2 Effets endocriniens :

1.2.1 sur la synthèse et le transport des HT

- l'étude de Ha, 2021 ⁽³⁵⁾ déjà citée, montre que la Beta-CYP augmente la synthèse des HT et que son action passe par la voie de la Protéine kinase C alpha (PKC α) qui joue un rôle clé *. De plus la β -CYP perturbe la biotransformation des hormones thyroïdiennes (HT) ainsi que leur transport en induisant les Désiodases de type 1 (DIO1)**, en inhibant le type 3 (DIO3) dans la thyroïde – et la synthèse des TTR dans le foie (une des protéines de transport de la T4). Selon cette étude la CYP, et plus exactement la Béta-CYP, aurait donc une action à plusieurs niveaux : sur la synthèse intra-thyroïdienne des HT, mais aussi sur leur distribution (via la protéine de transport TTR) et leur transformation en forme active ou non dans les tissus périphériques (dont le cerveau).

Rq : la Beta-CYP est un mélange particulier de composés cis et trans. Pas sûr que l'alpha-CYP donne les mêmes résultats. Et les effets sont subtils : à la fois augmentation de la synthèse des HT mais aussi inhibition de leur transformation en formes actives...

*National Library of Medicine : Protein kinase C (PKC) is a family of serine- and threonine-specific protein kinases that **can be activated by calcium** and the second messenger diacylglycerol. PKC family members phosphorylate a wide variety of protein targets and are known to be involved in diverse cellular signaling pathways. PKC family members also serve as major receptors for phorbol esters, a class of tumor promoters. Each member of the PKC family has a specific expression profile and is believed to play a distinct role in cells. The protein encoded by this gene is one of the PKC family members. This kinase has been reported to play roles in many different cellular processes, such as cell adhesion, cell transformation, cell cycle checkpoint, and cell volume control. Knockout studies in mice suggest that this kinase may be a fundamental regulator of cardiac contractility and Ca(2+) handling in myocytes. [provided by RefSeq, Jul 2008]

³⁵ Ha M, Huang X, Li L, Lu D, Liu C. **PKC α mediated by the PI3K/Akt-FOXO1 cascade facilitates cypermethrin-induced hyperthyroidism.** Sci Total Environ. 2021 Feb 25;757:143727. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143727. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33250241.

** DIO1 permet l'activation de la T4 en sa forme biologiquement active, la T3. La DIO3 est au contraire une enzyme de désactivation. Ces enzymes, ainsi que la présence ou non de transporteurs membranaires, jouent un rôle clé pour la détermination des niveaux d'HT intracellulaires. Quant à la TTR, chez l'homme elle est le premier acteur de transport direct des HT dans les tissus, l'autre protéine de transport, la TBG fonctionnant plutôt comme une réserve. Enfin la TTR est également synthétisée dans le placenta (Source : Barbara Demeneix, Le cerveau endommagé)

- dans la revue d'Andersen 2022 déjà citée ⁽³⁶⁾ : les auteurs ont recherché le niveau de preuve des effets neurodéveloppementaux liés à une exposition pré et/ou post-natale aux PYR, et évalué la plausibilité biologique de différents mécanismes d'action.

Afin d'évaluer le lien mécanistique les auteurs ont utilisé les données de la plateforme AOP de l'OCDE ⁽³⁷⁾ et recherché les événements-clés (KE) impliqués dans ces AOP. Trois AOP impactant les fonctions cognitives ont été sélectionnés : 13, 42, 54, plus l'AOP 17 car il contient un événement clé « neuro-inflammation. Les KEs retrouvés dans ces AOP étaient reliés à 3 modes d'action : 1) perturbation de la fonction des HT
2) altération des concentrations de BDNF,
et 3) neuro-inflammation

Un cheminement des résultats indésirables (AOP) est un cadre conceptuel qui décrit les connaissances existantes concernant le lien entre deux points d'ancrage - l'événement initiateur moléculaire (MIE) et un résultat indésirable (AO), reliés par une chaîne d'événements clés (KE) et les relations entre eux (KER).

Par exemple la réduction de la synthèse des TH est le (KE 277), la baisse des T4 plasmatiques (KE 281), et ce sont des KE partagés par les AOP 42 et 54.

perturbation de la fonction thyroïdienne :

Rappel : les HT sont essentielles pour le développement normal du cerveau et influencent la neurogénèse, la migration neuronale, la différenciation cellulaire en neurones et cellules gliales, la myélinisation et la synaptogénèse. Ces processus dépendant des HT sont cruciaux aussi bien pour le développement pré que post-natal du cerveau. De plus durant les 10-12 premières semaines de gestation, le fœtus dépend des hormones maternelles et il a été démontré qu'une déficience en HT maternelle (ou un excès) affecte le neurodéveloppement de la progéniture.

Le concept AOP suppose que l'étape essentielle du déclenchement de la chaîne d'événements est l'événement moléculaire initiateur (MIE). L'inhibition du NIS (Na⁺/I symporter, qui est un transporteur d'iode indispensable à la synthèse des HT), est l'un de ces MIE pour l'AOP 54. **La CYP est l'un des cinq PYR inhibant le NIS selon le**

³⁶ Andersen HR, David A, Freire C, Fernández MF, D'Cruz SC, Reina-Pérez I, Fini JB, Blaha L. **Pyrethroids and developmental neurotoxicity - A critical review of epidemiological studies and supporting mechanistic evidence.** Environ Res. 2022 Nov;214(Pt 2):113935. doi: 10.1016/j.envres.2022.113935. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35870501.

³⁷ <https://aopkb.oecd.org/background.html>

US EPA ToxCast cité par Andersen et col (étude in silico). Ces résultats sont (partiellement) confirmés dans une autre étude de modélisation toxicologique validée pour le NIS, Hallinger 2017 ⁽³⁸⁾ qui montre que la CYP est un inhibiteur faible à modéré du NIS.

Par ailleurs pour La Merrill l'inhibition du NIS est l'un des caractéristiques clés (KE) de la perturbation endocrinienne ⁽³⁹⁾.

- Outre la synthèse des HT d'autres voies peuvent perturber la fonction thyroïdienne comme le transport des HT (mais seule la perméthrine aurait été évaluée) ou l'interférence sur le récepteur des HT (cf paragraphe suivant).
- Les auteurs ont considéré un autre évènement clé, pris en compte dans les AOP, la perturbation du BDNF (qui est un KE pour les AOP 13 et 54) :

Rôle du BDNF : « BDNF belongs to the neurotrophin family of growth factors and is widely expressed in the developing and mature central nervous system (CNS). BDNF plays an important role in pre- and postnatal brain development by supporting survival of existing neurons and promoting growth and differentiation of new neurons and synapses (Binder and Scharfman, 2004; Park and Poo, 2013). At both pre- and postsynaptic sites, BDNF facilitates the release of neurotransmitters, and promotes the function of ion-transmitters and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) (Saghazadeh and Rezaei, 2017). Overall, BDNF seems to strengthen excitatory (glutamatergic) synapses and weaken inhibitory (GABAergic) synapses (Binder and Scharfman, 2004).

Le BDNF est un facteur de croissance nerveuse (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) dont le gène est régulé par les HT (B Demeneix, le cerveau endommagé). De plus selon Soderlund ⁽⁴⁰⁾ l'influx secondaire de calcium serait médié par les récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) sous contrôle du BDNF.

Concernant la CYP les auteurs ont retrouvé dans ToxCast un seul essai recherchant un effet agoniste sur les récepteurs NMDAR : celui-ci est négatif. **Par contre comme huit autres pyréthriinoïdes la CYP a provoqué un influx élevé de Ca²⁺** dans des cultures primaires de neurones néocorticaux de souris, de manière dépendante de la concentration (Cao, 2011 ⁽⁴¹⁾) Donc en faveur d'une augmentation de l'effet du BDNF.

1.2.2 sur les récepteurs RT : il est difficile de conclure

³⁸ Hallinger DR, Murr AS, Buckalew AR, Simmons SO, Stoker TE, Laws SC. **Development of a screening approach to detect thyroid disrupting chemicals that inhibit the human sodium iodide symporter (NIS)**. *Toxicol In Vitro*. 2017 Apr;40:66-78. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.006. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27979590.

³⁹ La Merrill, et al. **Consensus on the key characteristics of endocrine- disrupting chemicals as a basis for hazard identification**. *Nature Reviews/Endocrinology*, 2020

⁴⁰ Soderlund DM. **Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances**. *Arch Toxicol*. 2012 Feb;86(2):165-81. doi: 10.1007/s00204-011-0726-x. Epub 2011 Jun 28. PMID: 21710279; PMCID: PMC3218237.

⁴¹ Cao Z, Shafer TJ, Murray TF. **Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx in neocortical neurons**. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Jan;336(1):197-205. doi: 10.1124/jpet.110.171850. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20881019; PMCID: PMC3014305.

- Du et collaborateurs, en 2010 ⁽⁴²⁾ ont étudié par l'essai des gènes rapporteurs codant la Luciférase, les interactions avec les récepteurs des androgènes (RA), des oestrogènes (RE) et des hormones thyroïdiennes (RT) de 9 pyréthriinoïdes et de leurs métabolites DCCA et 3-PBA. La Cyperméthrine a des effets antagonistes du RA et comme tous les pyréthriinoïdes testés des effets antagonistes des récepteurs thyroïdiens (sauf le métabolite DCCA). Mais à un niveau plus faible que la deltaméthrine, l'étofenprox, la perméthrine et la tétraméthrine.

- l'équipe de Zekri 2021 ⁽⁴³⁾ : à partir de plusieurs tests in vitro et d'une analyse transcriptomique, les auteurs arrivent à la conclusion que bien que certains PYR provoquent une réponse cellulaire qui interfère parfois avec la signalisation de la TH, l'analyse RNA-seq n'a fourni aucune preuve qu'ils peuvent agir comme agonistes ou antagonistes de TR α 1.

1.2.3 sur l'expression de gènes impliqués dans le système thyroïdien

- in vivo cette étude chez le poisson zebre, Xu 2018 ⁽⁴⁴⁾ montre que la Permethrine et la Cyperméthrine ainsi que leurs métabolites altèrent l'expression de gènes impliqués dans le système thyroïdien et immunitaire.

1.3. Plausibilité d'un lien entre les effets endocriniens et les TND :

Concernant le lien entre exposition chez l'homme aux PYR (évaluée sur la présence de métabolites urinaires communs à plusieurs PYR dont la CYP), l'expertise de l'Inserm et la revue d'Andersen vont dans le même sens : **le niveau de preuve concernant le lien entre exposition aux PYR en période prénatale et les TND est élevé.**

Restent deux questions :

la CYP est-elle aussi impliquée dans les TND ? Est-ce par un mécanisme PE ?

Afin de répondre à la première question il faut :

- considérer les études expérimentales : in vivo les études portant sur l'exposition pendant la gestation montrent chez la souris (Laugeray et Guo) des effets à type de TND ; avec en particulier dans la seconde une réduction de la prolifération neuronale, de la maturation et de la différenciation cellulaire, et une augmentation de l'apoptose dans le cortex cérébral de la descendance, lors d'une exposition à de faibles doses de CYP durant la gestation.

⁴² Du G, Shen O, Sun H, Fei J, Lu C, Song L, Xia Y, Wang S, Wang X. **Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays.** Toxicol Sci. 2010 Jul;116(1):58-66. doi: 10.1093/toxsci/kfq120. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20410157.

⁴³ Zekri Y, Agnol LD, Flamant F. **In vitro assessment of pesticides capacity to act as agonists/antagonists of the thyroid hormone nuclear receptors.** iScience. 2021 Aug 8;24(9):102957. doi: 10.1016/j.isci.2021.102957. Erratum in: iScience. 2021 Oct 13;24(10):103246. PMID: 34485856; PMCID: PMC8403745.

⁴⁴ Xu C, Li X, Jin M, Sun X, Niu L, Lin C, et al.. **Early life exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to synthetic pyrethroids and their metabolites: a comparison of phenotypic and behavioral indicators and gene expression involved in the HPT axis and innate immune system.** Environ Sci Pollut Res Int. (2018) 25:12992–3003.

- considérer que si le 3-PBA est un métabolite commun à plusieurs pyréthriinoïdes rendant impossible de pointer le rôle de tel ou tel, il faut aussi noter, comme le soulignent les auteurs de l'étude d'Andersen (45) « que des associations ont été également retrouvées avec les cis et trans-DCCA suggérant que l'exposition à la perméthrine et à la cyperméthrine contribuent aux effets observés ».

Un mécanisme PE est-il en cause ?

- Afin d'évaluer la plausibilité biologique du lien Andersen et ses co-auteurs ont recherché les AOP identifiés (ce qui ne signifie pas que ce sont les seuls ni que leur description est complète) et impliqués dans la survenue de TND. Ils en ont identifié quatre (dont le 13 et le 54) avec certains événements clés (KE) communs.

La CYP est un inhibiteur du NIS , qui est un MIE de l'AOP 54.

La CYP agit également sur un KE (pour les AOP 13 et 54): la perturbation du BDNF

- l'étude de Ha (46), non prise en compte dans la revue d'Andersen, montre une action sur la synthèse des HT ainsi que sur les désiodases et la synthèse de protéines de transport (TTR) qui sont des KE.

En conclusion :

1) Concernant les effets observés :

Les données in-vivo montrent à des doses inférieures à la LOAEL des perturbations du neuro-développement :

- chez la souris - Laugeray (12) - après exposition pendant la gestation et J15 post natal des troubles du développement moteur, et des comportements inadaptés et une sociabilité anormale)

- sur des souris – Guo (15) – également après une exposition durant la gestation, réduction de la prolifération neuronale, de la maturation et de la différenciation cellulaire, et augmentation de l'apoptose dans le cortex cérébral de la descendance.

Chez l'humain les données disponibles portent sur des expositions à la famille des Pyréthriinoïdes : aussi bien l'expertise collective de l'Inserm (2021) que la revue

⁴⁵ Andersen HR, David A, Freire C, Fernández MF, D'Cruz SC, Reina-Pérez I, Fini JB, Blaha L. **Pyrethroids and developmental neurotoxicity - A critical review of epidemiological studies and supporting mechanistic evidence.** Environ Res. 2022 Nov;214(Pt 2):113935. doi: 10.1016/j.envres.2022.113935. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35870501.

⁴⁶ Ha M, Huang X, Li L, Lu D, Liu C. **PKC α mediated by the PI3K/Akt-FOXO1 cascade facilitates cypermethrin-induced hyperthyroidism.** Sci Total Environ. 2021 Feb 25;757:143727. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143727. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33250241.

d'Andersen (2022) estiment que **le niveau de preuve est élevé entre l'exposition aux PYR en période prénatale et les TND, au sens troubles neuro-développementaux.**

2) Concernant les effets sur l'axe thyroïdien :

La CYP étant une molécule chirale ces effets peuvent sans doute varier en fonction des différents ratios cis/trans composant les différentes CYP (alpha, bêta...).

- **in vitro** : inhibition du NIS, perturbation du BDNF, action sur la synthèse des HT, sur les désiodases et sur une protéine de transport.

- **in vivo** : l'étude de HA (14) montre une action complexe de la Bêta-CYP avec stimulation de la synthèse mais aussi inhibition de la Désiodase 3 et de la synthèse de la protéine de transport TTR.

- **chez l'homme** : il est possible que des expositions fortes aux PYR (d'ordre professionnel) induisent une hyperthyroïdie (16). Mais dans des gammes de concentrations correspondant à l'exposition de la population générale une étude japonaise ne montre rien (la médiane de concentration est cependant largement inférieure à celles retrouvées chez l'enfant dans l'étude Esteban), quand deux autres (Chevrier portant sur des nourrissons exposés pendant la gestation, et Hwang en population générale) vont dans le sens d'une hypothyroïdie.

3) Pour juger de la plausibilité biologique entre ces effets et les TND la recherche d'AOP impliqués dans les TND permet de montrer que :

- l'inhibition du NIS est un MIE reconnu dans l'AOP 54

- la CYP en perturbant le BDNF, agit sur un KE commun aux AOP 13 et 54

Les données de la littérature internationales montrent donc que la Cyperméthrine induit après exposition pendant la gestation des troubles du processus de neuro-développement ; et qu'il est biologiquement plausible qu'une perturbation de l'axe thyroïdien explique ces troubles.

2 La CYP est-elle un perturbateur de l'axe Hypothalamo-pituitaire-gonadique ?

2.1 Effets adverses

2.1.1 Sur l'appareil reproducteur mâle

2.1.1.1 chez l'animal in vivo :

Chez les souris mâles lors d'une exposition pendant l'allaitement : Wang 2010 (29) ; l'exposition maternelle à la cyperméthrine pendant la lactation altère le développement testiculaire et la spermatogénèse chez la progéniture de souris mâles.

Chez le rat l'exposition périnatale au CYP, Singh 2017 (47), a eu des effets significatifs et durables sur les fonctions reproductives des rats mâles de la génération F1, qui ont été transmis verticalement à la génération F2, entraînant des défauts de développement ;

Chez le rat mâle également, effets sur le système reproducteur Abdel-Razik 2021 (48) avec effets endocriniens mis en évidence ;

Chez le poisson atteint de l'appareil reproducteur dans les 2 sexes et effets endocriniens favorisant la voie oestrogénique, mis en évidence sur dosage hormonaux, Eni 2019 (49) ; enfin sur le système reproducteur du poisson zèbre, Aziz 2023 (32).

D'autre part dans une revue de Brander (50) 2016, on retrouve des études plus anciennes :

- Jaensson et al. 2007 : une exposition de 1 µg/l de CYP a perturbé le comportement reproducteur des tacons. (Ils affichaient moins d'événements de parade nuptiale, passaient moins de temps près des femelles nicheuses).

- Moore et al, 2001 : une exposition < 0,004 µg/l diminue la réponse des mâles à la phéromone (PGF2). De plus, l'exposition de la laitance et des œufs de saumon à une concentration de 0,1 microg l(-1) de cyperméthrine pendant la fécondation a par la suite réduit le nombre d'œufs fécondés. Les résultats de l'étude suggèrent que de faibles niveaux de cyperméthrine dans l'environnement aquatique peuvent avoir un effet significatif sur les populations de saumon atlantique en perturbant les fonctions de reproduction.

- Shi, 2011 : Pour explorer la toxicité potentielle de la cyperméthrine pour le développement, des embryons de poisson zèbre post-fécondation de 4 h ont été exposés à diverses concentrations de cyperméthrine (0, 25, 50, 100, 200 et 400 µg L⁻¹) jusqu'à 96 h. Des anomalies de développement ont été observées dès la concentration de 25 µg L⁻¹. (mais très au-dessus de la PNEC actuelle de 0,01 µg/l selon Anses)

Deux méta-analyses sont disponibles :

⁴⁷ Singh D, Bhagat S, Raijiwala P, Dighe V, Vanage G. **Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation.** Chemosphere. 2017 Oct;185:376-385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.138. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28709042

⁴⁸ Abdel-Razik RK, Mosallam EM, Hamed NA, Badawy MEI, Abo-El-Saad MM. **Testicular deficiency associated with exposure to cypermethrin, imidacloprid, and chlorpyrifos in adult rats.** Environ Toxicol Pharmacol. 2021 Oct;87:103724. doi: 10.1016/j.etap.2021.103724. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34416397.

⁴⁹ Eni G, Ibor OR, Andem AB, Oku EE, Chukwuka AV, Adeogun AO, Arukwe A. **Biochemical and endocrine-disrupting effects in Clarias gariepinus exposed to the synthetic pyrethroids, cypermethrin and deltamethrin.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2019 Nov;225:108584. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.108584. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31394255

⁵⁰ **hormones and decrease the time to puberty in the female offspring.** Environ Sci Pollut Res Int. 2023 Jan;30(2):2665-2675. doi: 10.1007/s11356-022-22328-x. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35931855.

Celle de Zhong 2021 ⁽⁵¹⁾ portant sur 19 études chez le rat: « *The sperm count, sperm motility, and testosterone level of rats exposed to cypermethrin and deltamethrin were lower than those of rats in control groups. Moreover, the sperm morphology of rats exposed to these pyrethroid pesticides was abnormal compared with that of rats in control groups.* »

Celle de Zhang, 2021 (34) : un total de 57 études in-vivo furent incluses dans la méta-analyse : 20 sur des rats et 37 sur des souris. L'analyse porte sur l'ensemble des 6 Pyréthriinoïdes retenus mais aussi sur chacun d'eux (dans les critères de sélection des études les PYR ne pouvaient pas être utilisés en mélange). En ce qui concerne la Cyperméthrine, chez le rat 4 études ont porté sur le nombre de spermatozoïdes, 4 sur la mobilité, 3 sur la morphologie, 5 sur le poids testiculaire, 4 sur le poids de l'épididyme et 7 comportent des dosages de testostérone. La CYP a eu un effet significatif sur chacun de ces paramètres sauf sur la morphologie. On observe la même chose dans les études chez la souris. De plus une exposition aux PYR indistinctement pendant la gestation et la lactation chez le rat réduit ces mêmes paramètres dans la génération F1 (sauf la testostérone).

« *Our results suggested that all seven pyrethroids had an overall negative effect on semen parameters. Each of them demonstrated a negative effect on sperm count, sperm motility, sperm morphology, testis weight, epididymal weight, and serum testosterone. Besides, we also found evidence that gestational and lactational pyrethroids exposure can lead to male reproductive damage in F1 offspring* »

A titre d'exemple Singh 2017, ⁽⁵²⁾, en génération F2 ; des rates gestantes furent gavées avec de la CYP à différentes doses (0, 1, 10, 25 mg/kg BW/day), doses sélectionnées en fonction de la NOAEL (5 mg/kg BW/day) et LOAEL (25 mg/kg BW/day). La progéniture mâle adulte fut accouplée avec des femelles non exposées : en F2 les fœtus présentaient des défauts de développement de l'appareil reproducteur.

Enfin l'étude de Ravula et Yenugu (35) montre que des rats soumis à une exposition orale à long terme à un mélange de pyréthriinoïdes (dont la CYP) à des doses correspondant à la consommation humaine, ont vu leur fécondité diminuer, même dans les générations suivantes nées de rats exposés. On a observé une diminution du nombre de spermatozoïdes, une baisse des activités des 3β- et 17β-hydroxy stéroïdes déshydrogénases, une altération de la capacitation des spermatozoïdes, une perturbation de l'expression des gènes liés à la spermatogenèse, à la stéroïdogenèse et des modifications épigénétiques des cellules germinales et de l'apoptose des cellules germinales ont été mises en évidence. Cette étude est importante dans le contexte de l'exposition humaine à plusieurs pyréthriinoïdes, et

⁵¹ Zhong M, Zhai Q, Zhang R, Yin H, Li J, Ma Z, Fang L, Zhang C, Li Y. **Effect of pyrethroid pesticides on the testis of male rats: A meta-analysis.** *Toxicol Ind Health.* 2021 Apr;37(4):229-239. doi: 10.1177/07482337211000979. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33724083

⁵² Singh D, Bhagat S, Raijiwala P, Dighe V, Vanage G. **Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation.** *Chemosphere.* 2017 Oct;185:376-385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.138. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28709042

devant l'impossibilité de les distinguer dans l'analyse de cette exposition (cf remarque dans le paragraphe suivant).

2.1.1.2 : chez l'homme :

Remarque avant d'examiner les données : la cyperméthrine subit une métabolisation hépatique rapide qui conduit à deux métabolites, l'acide **cis-DCCA et trans-DCCA** (acides cis- et trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique ou cis-, trans-Cl2CA), et l'acide 3-phénoxybenzoïque (**3-PBA**). Après conjugaison (glucurono, sulfo...) ils sont éliminés rapidement dans les urines. L'élimination urinaire représente entre 50 et 60 % de la dose absorbée par voie orale dont **plus de 90 % sont éliminés en 48 heures** ⁽⁵³⁾. Ce sont ces métabolites urinaires que les épidémiologistes recherchent dans les urines pour quantifier l'exposition. Comme ils sont communs à plusieurs pyréthrinoides, cela ne permet pas de connaître la part exacte de la Cyperméthrine dans l'exposition. Si cet aspect a une importance réglementaire, il a en a peu en revanche d'un point de vue sanitaire. Il faut donc prendre en compte ces données chez l'homme comme complémentaires des données expérimentales montrant les effets de la Cyperméthrine.

Zhang,2021(34) et ses co-auteurs ont complété leur méta-analyse des effets in-vivo sur l'appareil reproducteur mâle par une revue concernant les études chez l'homme : 17 études, dont 15 évaluant l'effet des PYR sur la qualité du sperme sont présentées.

6 évaluent la relation entre présence de métabolites des PYR dans les urines et la qualité du sperme (Meeker 2008 et 2009, Radwan 2014, Xia 2008, Hu 2020). Toutes sauf une (Yoshinaga 2014) retrouvent une corrélation entre présence de métabolites dans les urines et qualité du sperme. Une étude in-vitro (Zalata, 2014 ⁽⁵⁴⁾) montre que la CYP peut altérer la qualité du sperme et entraîner des dommages à l'ADN des spermatozoïdes. Plusieurs études ont montré la relation entre la présence de métabolites urinaires (3-PBA et Cis-DCCA) et dommage à l'ADN des spermatozoïdes. Trois études ont porté sur la fécondabilité après exposition aux PYR. Deux concernant des travailleurs sous serres exposés, ont montré une réduction de la fertilité. La troisième, réalisée au Japon (Toshima, 2012 ⁽⁵⁵⁾) en population générale montre, chez les partenaires mâles de couples consultant pour infertilité, une association positive entre exposition aux PYR (3-PBA urinaire) et qualité du sperme.

Enfin Jurewicz et al (39), ont montré que le taux de métabolites urinaires de PYR était négativement corrélé avec le ratio de chromosomes spermatiques Y/X.

2.1.2 Effets sur l'avance ou le retard de la puberté :

⁵³ https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox/dosage.html?refINRS=Dosage_385

⁵⁴ Zalata A, Elhanbly S, Abdalla H, Serria MS, Aziz A, El-Dakrooy SA, El-Bakary AA, Mostafa T. **In vitro study of cypermethrin on human spermatozoa and the possible protective role of vitamins C and E.** *Andrologia*. 2014 Dec;46(10):1141-7. doi: 10.1111/and.12206. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24329529.

⁵⁵ Toshima H, Suzuki Y, Imai K, Yoshinaga J, Shiraishi H, Mizumoto Y, et al. **Endocrine Disrupting Chemicals in Urine of Japanese Male Partners of Subfertile Couples: A Pilot Study on Exposure and Semen Quality.** *Int J Hygiene Environ Health* (2012) 215(5):502–6. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.09.005

2.1.2.1 chez l'animal in vivo

Puberté précoce chez les souris mâles après exposition post natale : Ye 2017 ⁽⁵⁶⁾ accélération pour toutes les doses testées, dont 2 doses inférieures ou égales à la NOAEL ! ; chez la souris l'exposition périnatale à de faibles doses de cyperméthrine induit des hormones liées à la puberté et réduit le délai avant la puberté chez la progéniture féminine (effets endocriniens et sur le génome mis en évidence) Gan 2022 ⁽⁵⁷⁾

Revue de Sakali, 2021 ⁽⁵⁸⁾ : elle porte sur les preuves actuelles de l'impact des pesticides perturbateurs endocriniens sur la chronologie des étapes de la puberté féminine et masculine chez les animaux (ouverture vaginale, premier œstrus et séparation balanopréputiale) et chez les humains (thélarche, ménarche, gonadarche). On retrouve, concernant la CYP, outre l'étude de Ye, 2017 sur la souris, deux autres études chez le rat, Singh 2017 ⁽⁵⁹⁾ et 2020 (43) après exposition gestationnelle et postnatale : là c'est un retard de puberté qui est observé aussi bien chez les mâles (même à faible dose 1mg/kg inférieure à la NOAEL cf table 2 Sakali) que chez les femelles.

On observe donc un impact sur le délai d'apparition de la puberté différent chez les souris (avance) et chez les rats (retard)

2.1.2.2 Chez les humains :

Dans la même revue de Sakali, on retrouve deux études de Ye, 2017 qui montrent chez les filles ⁽⁶⁰⁾ une association positive entre la concentration de 3-PBA urinaire et un retard des premiers signes pubertaires et de l'âge de la ménarche. C'est l'inverse chez le garçon, le niveau de 3-PBA étant corrélé avec une accélération de la puberté ⁽⁶¹⁾ ainsi qu'une élévation de FSH et LH.

2.2 Effets endocriniens sur l'axe HPG

2.2.1 modifications des concentrations hormonales : testostérone, FSH et LH

⁵⁶) Ye X, Li F, Zhang J, Ma H, Ji D, Huang X, Curry TE Jr, Liu W, Liu J. **Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Accelerates Pubertal Onset in Male Mice via Disrupting Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.** *Environ Sci Technol.* 2017 Sep 5;51(17):10212-10221. doi: 10.1021/acs.est.7b02739. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28731686.

⁵⁷ Gan H, Zhu B, Zhou F, Ding Z, Liu J, Ye X. **Perinatal exposure to low doses of cypermethrin induce the puberty-related hormones and decrease the time to puberty in the female offspring.** *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Jan;30(2):2665-2675. doi: 10.1007/s11356-022-22328-x. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35931855.

⁵⁸ **Mediated Endocrine Disruptors Employed in Agriculture.** *Nutrients.* 2021 Nov 22;13(11):4184. doi: 10.3390/nu13114184. PMID: 34836437; PMCID: PMC8622967.

⁵⁹ Singh D, Bhagat S, Raijiwala P, Dighe V, Vanage G. **Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation.** *Chemosphere.* 2017 Oct;185:376-385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.138. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28709042

⁶⁰) Ye, X.; Pan, W.; Zhao, Y.; Zhao, S.; Zhu, Y.; Liu, W.; Liu, J. **Association of Pyrethroids Exposure with Onset of Puberty in Chinese Girls.** *Environ. Pollut.* 2017, 227, 606–612

⁶¹ **Levels and Pubertal Development in Chinese Boys.** *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51, 6379–6386

- Selon la revue de Roychoudhury, 2021 ⁽⁶²⁾ concernant les facteurs environnementaux induisant un stress oxydatif on retrouve, concernant la CYP, ces deux études in-vivo :

- une étude de 12 semaines par voie orale chez le rat, Ala-Eldin ⁽⁶³⁾, qui montre que l'administration de cyperméthrine à 12.5 mg/kg body weight a entraîné une réduction de la testostéronémie et du poids des testicules.

« The decline in serum testosterone levels upon exposure to cypermethrin is possibly due to oxidative stress-mediated damage to testicular tissues, including Leydig cells. Oxidative stress reduces the viability of different cell types in testicular tissues, thus hampering testosterone synthesis »

- une étude de Sharma ⁽⁶⁴⁾ chez le rat, montre que la cyperméthrine a réduit les concentrations de Testostérone, FSH et LH. Cela suggère que la Cyperméthrine perturbe l'axe Hypothalamo-pituitaire gonadique.

- Ye, 2017 ⁽⁶⁵⁾ a montré sur des **souris** mâles qu'une exposition postnatale précoce à la Cyperméthrine induit une augmentation dose-dépendante des concentrations de LH et FSH ainsi qu'une accélération de la maturation sexuelle. Cette même étude a montré que la Cyp peut induire l'expression des gènes codant les gonadotrophines dans l'hypophyse (cf paragraphe suivant pour la compréhension du mécanisme).

2.2.2 action sur les cellules de Sertoli et la spermatogénèse :

- Wang, 2021 : mécanisme de la toxicité sur les cellules de Sertoli ⁽⁶⁶⁾. Etude sur cellules de souris TM4. Elle montre que la cyperméthrine induit l'apoptose en impliquant la voie mitochondriale associée au Ca²⁺ (Mitochondrial pathway is regulated by Bcl-2 family and Ca²⁺/CaM/CaMKII pathway).

- Dans une étude ultérieure la même équipe, Shen 2022 (50) a montré que l'apoptose induite par la cyperméthrine dans les cellules TM4 est régulée par la voie du Réticulum endoplasmique impliquant PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP.

- Irani, 2022 (51) montre in vivo les effets moléculaires sur la génération F1 adulte de rates exposées à la CYP pendant la gestation et jusqu'au 21^{ème} jour post natal (à 0, 1, 10, 25 mg/kg pc/jour). Conclusions : « Cette étude fournit des preuves de la perturbation de la stéroïdogenèse gonadique et de la gamétogenèse, ainsi que le premier rapport sur

⁶² **Environmental Factors-Induced Oxidative Stress: Hormonal and Molecular Pathway Disruptions in Hypogonadism and Erectile Dysfunction.** Antioxidants (Basel). 2021 May 24;10(6):837. doi: 10.3390/antiox10060837. PMID: 34073826; PMCID: PMC8225220.

⁶³ Ala-Eldin, E.A.; El-Safei, D.A.; Abouhashem, N.S. **Individual and combined effect of chlorpyrifos**

⁶⁴ Sharma, P.; Huq, A.U.; Singh, R. **Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is preserved by resveratrol.** J. Hum. Reprod. Sci. **2014**, *7*, 99–106.

⁶⁵ Ye X, Li F, Zhang J, Ma H, Ji D, Huang X, Curry TE Jr, Liu W, Liu J. **Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Accelerates Pubertal Onset in Male Mice via Disrupting Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.** Environ Sci Technol. **2017** Sep 5;51(17):10212-10221. doi: 10.1021/acs.est.7b02739. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28731686.

⁶⁶ Wang HX, Zhang R, Li Z, Wang LS, Yu Y, Wang Q, Ding Z, Zhang JP, Zhang MR, Xu LC. **Cypermethrin induces Sertoli cell apoptosis through mitochondrial pathway associated with calcium.** Toxicol Res (Camb). 2021 Jun 19;10(4):742-750. doi: 10.1093/toxres/tfab056. PMID: 34484665; PMCID: PMC8403601.

l'épigénome aberrant des spermatozoïdes suite à l'exposition périnatale au CYP chez la progéniture F1. **L'impact de l'exposition au CYP sur l'expression de l'ARNm/des protéines de gènes clés impliqués dans la stéroïdogénèse gonadique, la spermatogénèse et l'ovogénèse a montré une dose-réponse non monotone.** Les voies de la stéroïdogénèse et de la gamétogénèse affectées ont permis d'élucider les raisons probables des perturbations hormonales observées précédemment ».

Les études précédentes de cette équipe, d'exposition périnatale aux CYP sur la progéniture mâle et femelle F1 ont fait état d'un retard de puberté, d'une réduction du nombre et de la motilité des spermatozoïdes, d'un cycle œstral irrégulier et d'une modification du nombre de follicules ovariens chez les rats mâles et femelles F1, respectivement. « Nos études ont également montré une altération des hormones stéroïdes sériques (œstrogène, progestérone et testostérone) et de l'expression de leurs récepteurs respectifs dans les cellules testiculaires et ovariennes.... Nos études ont en outre démontré que l'administration périnatale de CYP entraînait une subfertilité chez les rats F1 mâles et femelles et signalait des défauts de développement dans la génération F2 ».

2.2.3 Sur les récepteurs : la CYP est un antagoniste du RA

- L'interaction avec le RA avait été montrée auparavant (Xu et al., 2008 ⁽⁶⁷⁾, Sun et al., 2007 ⁽⁶⁸⁾), par le test du gène rapporteur du récepteur aux androgènes (RA), selon Hu et col ⁽⁶⁹⁾ qui ont montré que la Cyperméthrine inhibait l'interaction AR N/C (amino- et carboxyl-terminale) induite par la DHT (5 α -dihydrotestostérone, agoniste puissant du récepteur AR) requise pour le potentiel de transcription.

- Selon Singh 2017⁽⁷⁰⁾, expérience chez le rat « A significant delay in the age of testicular descent and prepuce separation was observed at 1 and 25 mg/kg doses of CYP. At the same dose level, reproductive organ development and their functions were also affected. A significant alteration in testicular histology, **expression of steroid hormone receptors**, and *circulatory steroid hormones was observed throughout development* »

- Ding, 2020⁽⁷¹⁾ montre que la CYP a des effets inhibiteurs de la transcription des AR en inhibant l'interaction du récepteurs avec ses co-activateurs (androgen receptor-associated protein 70 (ARA70) and androgen receptor-associated protein 55 (ARA55).

⁶⁷ L.C. Xu et al. [Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro](#) Toxicology (2008)

⁶⁸ H. Sun et al. [Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay](#) Chemosphere (200)

⁶⁹ Hu, Jin-xia, Li, Yan-Fang, Pan, Chen, Zhang, Jin-Peng, Wang, Hong-Mei, Li, Jing, Xu, Li-Chun. **Anti-androgen effects of cypermethrin on the amino- and carboxyl-terminal interaction of the androgen receptor** VL - 292 DO - 10.1016/j.tox.2011.11.019 JO - Toxicology ER

⁷⁰ Singh D, Bhagat S, Raijiwala P, Dighe V, Vanage G. **Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation.** Chemosphere. 2017 Oct;185:376-385. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.138. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28709042

⁷¹ Cao Z, Shafer TJ, Murray TF. **Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx in neocortical neurons.** J Pharmacol Exp Ther. 2011 Jan;336(1):197-205. doi: 10.1124/jpet.110.171850. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20881019; PMCID: PMC3014305.

- de même Sheikh, 2023 ⁽⁷²⁾ a examiné dans cette étude les effets potentiellement toxiques de deux pyréthrinoïdes courants, la cyperméthrine et la deltaméthrine, sur la signalisation du récepteur des androgènes (AR). Les résultats sont en faveur d'une perturbation potentielle de la signalisation AR par la cyperméthrine et la deltaméthrine, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement androgénique et une infertilité masculine subséquente selon les auteurs.

2.2.4 Sur l'expression de différents gènes :

- Dans la revue de Sakali 2021 ⁽⁷³⁾ : « *Each endocrine-disrupting pesticide may employ one, or multiple, mechanisms of action. For instance, among pyrethroids, cypermethrin impairs the maturation of the HPG axis by interacting with the sodium and calcium channels in hypothalamic, pituitary, and testicular cells. In addition, it disrupts the expression of various genes coding for enzymes, such as steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP11A1) inside male gonadal cells, as well as the genes regulating the production of the FSH and LH subunits* »⁽⁷⁴⁾

- cf étude de Ye 2017 ⁽⁷⁵⁾ déjà décrite montrant que la Cyp peut induire l'expression des gènes codant les sous-unités gonadotrophines dans l'hypophyse.

Or selon YE « Calcium (Ca 2+) signaling plays an essential role in the signal transduction cascade necessary for the secretion of gonadotropins from anterior pituitary gonadotropic cells (Mulvaney et al., 1999; Reiss et al., 1997). We have previously indicated that the selective inhibitor for L-type voltage-gated calcium channels (VGCCs), nimodipine, was able to block CP-induced gonadotropin subunit gene transcription in pituitary tissues of male mice, suggesting Ca 2+ signaling is involved in CP-induced gonadotropin synthesis »

- dans cette étude de 2018, Li et col ⁽⁷⁶⁾ ont cherché par quel mécanisme la CYP à concentration de 1 (10⁻⁹ Mol) à 100 nM perturbe la synthèse des gonadotrophines sur cellules pituitaires murines de la lignée LβT2. Ils ont montré que la Cyperméthrine perturbait l'homéostasie du Ca²⁺ par deux voies distinctes et indépendantes : un influx de Ca²⁺ extracellulaire par une action de la CYP sur les canaux calciques membranaires (en plus de leur action principale sur les canaux sodiques membranaires, il a été démontré que certains

⁷² Sheikh IA, Beg MA, Hamoda TA, Mandourah HMS, Memili E. **Androgen receptor signaling and pyrethroids: Potential male infertility consequences.** Front Cell Dev Biol. 2023 Apr 28;11:1173575. doi: 10.3389/fcell.2023.1173575. PMID: 37187621; PMCID: PMC10175798.

⁷³ Sakali AK, Bargiota A, Fatouros IG, Jamurtas A, Macut D, Mastorakos G, Papagianni M. **Effects on Puberty of Nutrition-Mediated Endocrine Disruptors Employed in Agriculture.** Nutrients. 2021 Nov 22;13(11):4184. doi: 10.3390/nu13114184. PMID: 34836437; PMCID: PMC8622967

⁷⁴ Andersen HR, David A, Freire C, Fernández MF, D'Cruz SC, Reina-Pérez I, Fini JB, Blaha L. **Pyrethroids and developmental neurotoxicity - A critical review of epidemiological studies and supporting mechanistic evidence.** Environ Res. 2022 Nov;214(Pt 2):113935. doi: 10.1016/j.envres.2022.113935. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35870501.

⁷⁵ Ye X, Li F, Zhang J, Ma H, Ji D, Huang X, Curry TE Jr, Liu W, Liu J. **Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Accelerates Pubertal Onset in Male Mice via Disrupting Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.** Environ Sci Technol. 2017 Sep 5;51(17):10212-10221. doi: 10.1021/acs.est.7b02739. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28731686.

⁷⁶ Li F, Ma H, Liu J. **Pyrethroid Insecticide Cypermethrin Modulates Gonadotropin Synthesis via Calcium Homeostasis and ERK1/2 Signaling in LβT2 Mouse Pituitary Cells.** Toxicol Sci. 2018 Mar 1;162(1):43-52. doi: 10.1093/toxsci/kfx248. PMID: 29149324

pyréthriinoïdes avaient une action via les canaux calciques) et une libération de Ca²⁺ intracellulaire par inhibition de la Ca²⁺-ATPase dans les cellules LβT2. (blocage d'une pompe d'efflux).

Avec pour conséquence une activation de la voie des kinases ERK1/2 conduisant à la transcription des gènes codant pour les sous unités des hormones gonadotrophines hypophysaires LH et FSH.

2.3. Plausibilité d'un lien entre les effets endocriniens constatés sur l'axe HPG et effets adverses :

Nous avons donc les preuves expérimentales de la toxicité de la Cyperméthrine sur l'appareil reproducteur mâle. Avec des effets in-vivo sur 3 espèces différentes, et des effets confirmés par deux méta-analyses (l'une chez le rat et l'autre chez le rat et la souris). De plus il existe un lien chez l'homme entre l'exposition aux pyréthriinoïdes et la qualité du sperme, chez des travailleurs exposés et en population générale.

Concernant l'impact sur le délai d'apparition de la puberté il est différent chez les souris (avance dans les deux sexes) et chez les rats (retard). Chez les humains on dispose d'une seule étude épidémiologique : elle montre que le 3-PBA (métabolite commun à plusieurs PYR) est associé à des perturbations pubertaires de sens opposé chez les filles (retard pubertaire) et chez les garçons (avance pubertaire).

In vivo on retrouve des perturbations hormonales (Testostérone, FSH, LH) à priori dans un sens opposé chez le rat (diminution) et chez la souris (augmentation mais lors d'une exposition post-natale).

In vivo, est mise en évidence une action sur les cellules de Sertoli et la spermatogénèse. Si plusieurs mécanismes d'action peuvent être en cause (comme la perturbation des canaux calciques voltage-dépendant, il était logique de rechercher un effet antagoniste des récepteurs des androgènes AR.

L'AR appartient à la super-famille des récepteurs nucléaires : ce sont des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par la présence de ligands spécifiques. Ils contrôlent des réseaux géniques complexes impliqués dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et l'homéostasie. La grande famille des récepteurs nucléaires inclut des récepteurs des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, et des dérivés actifs des vitamines A et D. L'activation du AR peut cependant se produire de manière indépendante du ligand, médiée par des facteurs de croissance et des cytokines, telle que l'interleukine-6 (IL-6). Cette cytokine multifonctionnelle, joue un rôle essentiel dans le réseau de signalisation des cytokines et peut activer le RA sans androgènes⁽⁷⁷⁾. L'étude de Wang montre que l'antagonisme AR est médié par l'IL-6 induite par la cyperméthrine. (Ce

⁷⁷ Wang Q, Zhou JL, Wang H, Ju Q, Ding Z, Zhou XL, Ge X, Shi QM, Pan C, Zhang JP, Zhang MR, Yu HM, Xu LC. **Inhibition effect of cypermethrin mediated by co-regulators SRC-1 and SMRT in interleukin-6-induced androgen receptor activation.** Chemosphere. 2016 Sep;158:24-9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.053. Epub 2016 May 27. PMID: 27239967.

phénomène est lié à la répression du recrutement des co-régulateurs SRC-1 et SMRT à l'AR d'une manière indépendante du ligand).

En se référant à la plateforme AOP - wiki, l'antagonisme du RA est un MIE commun à plusieurs AOP (345 / diminution de la fertilité, réduction du nombre d'ovocytes ovulés, 19 / altération de la capacité de reproduction des mammifères mâles, ou 306 et 344).

3 Conclusion concernant l'axe HPG :

- **le niveau de preuve des études concernant les effets in vivo sur l'appareil reproducteur mâle est élevé** puisqu'il repose sur deux méta-analyses. De plus il existe des données humaines qui montrent un lien entre l'exposition aux pyréthriinoïdes et la qualité du sperme, chez des travailleurs exposés et en population générale.

Malheureusement nous n'avons pas d'accès aux doses d'exposition utilisées dans ces deux méta-analyses. Par contre l'exposition humaine est de nature environnementale.

- **plusieurs études montrent une perturbation des hormones de l'axe HPG**, différente chez le rat et la souris, ou peut-être aussi selon la période d'exposition.

- **s'il existe comme souvent, plusieurs mécanismes d'action en cause, un MIE (antagonisme du RA) impliqué dans plusieurs AOP est retrouvé, rendant plausible l'explication des effets observés par un mécanisme PE.**

Conclusion générale

Les données de la littérature internationale sont fournies concernant les Pyréthriinoïdes, mais aussi la Cyperméthrine.

- Elles permettent d'affirmer que la CYP est un PE impactant en particulier deux axes : l'axe thyroïdien et l'axe hypothalamo-pituitaire-gonadique.

- Dans ces deux cas des effets cliniques (TND, perturbation de la puberté et effets sur l'appareil reproducteur mâle) sont documentés (avec un niveau de preuve moindre pour la perturbation de la puberté)

- des modes d'action endocriniens sont établis, avec un niveau de preuve inférieur concernant la thyroïde

- la plausibilité biologique du lien entre ces modes d'action endocriniens et les effets observés est forte en raison, dans l'un et l'autre cas, de la mise en évidence de mécanismes

moléculaires initiateurs (MIE) ou d'évènements clés (KE) reconnus par le monde scientifique et les experts de l'OCDE.

La CYP doit être considérée comme un PE

Annexe 1

Correspondance produit parent -métabolites selon CHU de Limoges et INRS :

Produits parents	Perméthrine	Permethrine	Deltamethrine	Cyfluthrine
	Fenvalérate	Cypermethrine		
	Esfenvalerate	Cyfluthrine		
	Deltamethrine			
	Fluvalinate			
	Phenothrine			
Métabolites	Cypermethrine 3-PBA	CICA cis et trans ou acide cis-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2- diméthylcyclopropane- carboxylique (cis-DCCA)	Br2CA ou cis- DBCA (ou acide cis-3- (2,2-dibromovinyl)-2,2- diméthylcyclopropane-1- carboxylique ou cis-Br2CA	4F-PBA

