

Co-exposition des professionnels de la lutte anti-vectorielle au DEET et aux insecticides

Avis de l'Anses et de l'Afssaps
Rapport d'expertise collective

Septembre 2010

Édition scientifique



Co-exposition des professionnels de la lutte anti-vectorielle au DEET et aux insecticides

Risques neurotoxiques
liés à la co-exposition
des professionnels de la lutte
antivectorielle au DEET
et à d'autres substances
insecticides

Avis de l'Anses et de l'Afssaps
Rapport d'expertise collective

Septembre 2010

Édition scientifique

Le 23 septembre 2010

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
et
de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**relatif aux risques neurotoxiques liés à la co-exposition des professionnels
de la lutte antivectorielle au DEET et à d'autres substances insecticides**

L'Anses a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'alimentation, de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter. Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du Code de la santé publique).

L'Afssaps a pour mission de garantir le meilleur niveau possible de sécurité d'emploi, de qualité et de bon usage des produits de santé compte tenu des bénéfices et des risques associés aux divers produits. Agence d'évaluation et d'expertise, elle est également une agence de décision dans le domaine de la régulation sanitaire des produits de santé. Son Directeur général exerce au nom de l'État cette attribution, qui porte chaque année sur plusieurs dizaines de milliers de décisions. L'article L. 5311-1 du Code de la santé publique définit les missions de l'Afssaps. Par ailleurs, selon l'arrêté du 19 mai 2004, modifié le 27 juillet 2007, l'Afssaps est chargé d'évaluer l'efficacité et les risques pour les consommateurs liés à l'utilisation des produits répulsifs sans action thérapeutique sur la peau saine et destinés à repousser les insectes et les acariens.

1. PRÉSENTATION DE LA QUESTION POSÉE

L'Afssaps a été saisie le 12 août 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) et l'Afssset (dont les missions ont été reprises par l'Anses depuis le 1^{er} juillet 2010) le 16 novembre 2009 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale du travail (DGT), afin de réaliser l'analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)¹ et d'en apprécier sa portée en ce qui concerne les co-expositions des professionnels de la lutte antivectorielle (LAV), qui sont exposés au N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET) et à des insecticides ayant une action anticholinestérasique ou sur le système de neurotransmission cholinergique.

¹ Corbel V., Stankiewicz M., Pennetier C. *et al.* (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biology* 7: 47.

2. CONTEXTE

La lutte contre les insectes vecteurs de maladies telles que le chikungunya, la dengue ou le paludisme constitue un véritable enjeu de santé publique en France, principalement dans les régions d'outre-mer. En absence de vaccins ou de traitements thérapeutiques, la lutte antivectorielle et en particulier les traitements insecticides, réalisés par des opérateurs professionnels, sont essentiels. La protection peut également être individuelle lorsqu'il s'agit par exemple de répulsifs corporels. Dans ce contexte, les répulsifs corporels sont utilisés par le public ainsi que par les professionnels de LAV. Ces répulsifs peuvent contenir du DEET, une substance active utilisée depuis les années 1960. Il est recommandé par le Haut conseil de la santé publique de les appliquer sur la peau, uniquement sur les parties non couvertes par des vêtements². Ainsi, pour les opérateurs de LAV qui sont équipés d'une combinaison de protection pendant les opérations d'épandage, la co-utilisation du DEET et d'insecticides est évitée. Néanmoins, les opérateurs peuvent s'appliquer du DEET avant ou après les opérations de traitements insecticides ce qui pourrait impliquer une co-exposition systémique susceptible de favoriser une augmentation de la neurotoxicité si toutefois les deux substances agissent par les mêmes mécanismes d'action.

L'étude de Corbel *et al.* (2009) émet l'hypothèse que le DEET inhiberait les cholinestérases, enzymes clés du système nerveux. Or, c'est un mécanisme commun à certaines substances insecticides. Par conséquent, la co-exposition des professionnels de la LAV au DEET et aux insecticides soulève la question d'une possible interaction entre ces substances et par là même à une augmentation des effets neurotoxiques.

L'Afssaps a été chargée de vérifier si les hypothèses émises par Corbel *et al.* étaient de nature à remettre en cause son évaluation relative au DEET et par conséquent, les recommandations encadrant l'utilisation de ce répulsif corporel pour les consommateurs. Le 4 janvier 2010, l'Afssaps a conclu que cette étude n'était pas de nature à modifier l'évaluation du risque en cours de discussion au niveau européen et par là même, les recommandations de l'Afssaps publiées dans le Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) du 2 juin 2009, concernant la limite d'âge d'utilisation du DEET chez le jeune enfant aux concentrations efficaces recommandées à partir de 30 mois et jusqu'à 12 ans pour une concentration en DEET de 20 à 35 %.

Pour rappel, dans le cadre de la réglementation européenne relative aux biocides, l'efficacité et le risque d'utilisation du DEET ont été évalués et l'inscription à l'annexe I de la Directive 98/8/CE du DEET en tant que répulsif corporel a été votée par les Etats membres le 12 mars 2010.

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'Anses a coordonné l'instruction de cette saisine avec l'Afssaps. L'Anses a par ailleurs confié à son Comité d'experts spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine. De son côté, l'Afssaps a sollicité l'avis de son Groupe d'experts (GE) « Evaluation des risques et de l'efficacité de substances et produits biocides ». Les coordinateurs de la saisine des deux agences appuyés par trois rapporteurs du CES de l'Anses ont été chargés de la préparation du rapport d'expertise.

² Bulletin épidémiologique hebdomadaire du 1^{er} juin 2010 : recommandations sanitaires pour les voyageurs.

Les travaux ont été soumis régulièrement au CES de l'Anses, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport d'expertise tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les critères de compétence, d'indépendance et de transparence, tout en assurant la traçabilité.

Cette expertise est ainsi issue d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Le présent avis est une synthèse du rapport issu de cette expertise collective intitulé « Risques neurotoxiques liés à la co-exposition des professionnels de la lutte antivectorielle au DEET et à d'autres substances insecticides » qui a été approuvé par le CES lors de sa séance du 27 mai 2010.

4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Choix des insecticides d'intérêt pour l'évaluation d'une co-exposition avec le DEET

L'étude d'interaction potentielle entre plusieurs substances est difficile à mettre en œuvre dans la plupart des cas. Il est généralement admis que pour des substances ayant des mécanismes d'action ou effets communs ou similaires, la probabilité d'interaction est élevée. Le DEET étant suspecté d'être un inhibiteur potentiel des cholinestérases, cet effet devrait être considéré dans le choix des insecticides d'intérêt. Le mécanisme d'inhibition des cholinestérases est un mécanisme commun à deux classes d'insecticides : les organophosphorés et les carbamates. Cependant, ces derniers n'étant plus utilisées sauf en cas d'épidémies avérées il a semblé opportun d'élargir le choix aux insecticides neurotoxiques, quel que soit leur mode d'action.

Par conséquent, seules les substances ayant un effet neurotoxique et qui sont effectivement employées ou potentiellement utilisables en LAV ont été retenues.

Etudes de l'interaction potentielle en cas de co-exposition

Les études toxicologiques mettant en œuvre la co-exposition aux substances d'intérêt restent à ce jour le seul moyen d'étudier les interactions possibles. Ainsi, pour répondre à cette saisine, une recherche bibliographique exhaustive a été effectuée.

En absence de données expérimentales, l'évaluation du risque lié à la co-exposition à plusieurs substances est théoriquement fondée sur l'identification de substances présentant des mécanismes d'action communs ou similaires ou ayant le même organe cible. Les concepts disponibles sont issus de ceux proposés par l'US EPA (United States Environmental Protection Agency, 2000) et l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2001).

Afin de réaliser une évaluation du risque pour le DEET en co-exposition avec des insecticides utilisés en LAV, il était nécessaire d'étudier la faisabilité de ces concepts et d'effectuer en premier lieu :

- une revue des données toxicologiques disponibles relatives aux mécanismes impliqués dans la neurotoxicité du DEET et des insecticides pouvant agir par des mécanismes d'action communs ou similaires ou ayant les mêmes organes cibles,
- une analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009) afin de vérifier l'hypothèse avancée par les auteurs selon laquelle le DEET est un inhibiteur des cholinestérases et qu'il interagit avec d'autres substances anticholinestérasiques ou ayant une action sur le système de neurotransmission cholinergique.

5. RÉSULTAT DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

Choix des insecticides d'intérêt pour l'évaluation d'une co-exposition avec le DEET

Plusieurs insecticides peuvent moduler négativement l'acétylcholinestérase de manière :

- directe : les carbamates (bendiocarbe) et les organophosphorés (téméphos, malathion),
- indirecte ou secondaire : les pyréthriinoïdes de synthèse tels que la deltaméthrine et la perméthrine (par action sur les canaux de sodium), le spinosad (agoniste de l'acétylcholine), l'étofenprox (pseudopyréthriinoïde) et l'indoxacarbe (par action sur la transmission axonale et sur les canaux sodiques).

L'exposition des professionnels aux insecticides est plus importante pour les insecticides à usage adulticide, destinés à une pulvérisation spatiale, que pour les insecticides à usage larvicide. Les principaux insecticides actuellement utilisés dans la LAV sont la deltaméthrine pour les traitements adulticides et le Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) pour les traitements larvicides. Le téméphos (larvicide) et le malathion (adulticide) peuvent encore être exceptionnellement utilisés. Le pyriproxyfène et le spinosad sont à l'étude pour être utilisés en traitement larvicide.

Le Bti, au vu de ses effets de perforation de la paroi du tube digestif, n'a pas *a priori* d'effet neurotoxique. L'intérêt de considérer les organophosphorés a été jugé faible étant donné que cette famille de substances ne sera bientôt plus disponible pour des usages de LAV.

Au final, seule la deltaméthrine est effectivement utilisée dans le cadre de la LAV et dispose d'études montrant des effets neurotoxiques chez les animaux de laboratoire comme chez l'homme.

Etudes disponibles de co-exposition impliquant le DEET

Il n'existe actuellement pas d'études expérimentales de co-exposition au DEET et aux substances utilisées ou potentiellement utilisables en LAV. Cependant, outre l'étude de Corbel *et al.* (2009), quelques études de co-exposition au DEET avec des substances neurotoxiques sont disponibles, notamment celles réalisées pour expliquer les effets observés chez les soldats américains après leur retour aux Etats-Unis, appelés aussi « syndrome de la guerre du Golfe ». Les substances qui ont été étudiées sont le bromure de pyridostigmine (médicament), le chlorpyrifos (insecticide organophosphoré non utilisé en LAV), la perméthrine (insecticide pyréthriinoïde de synthèse non utilisé en LAV) et le propoxur (insecticide carbamate non utilisé en LAV). Une des hypothèses avancées pour expliquer ce syndrome est la co-exposition à ces substances neurotoxiques.

L'analyse de ces études de co-exposition au DEET avec d'autres substances neurotoxiques a pu montrer une augmentation des effets chez les animaux, lorsqu'elles sont associées. Cependant, les mécanismes d'action avancés par les différents auteurs pour expliquer cette exacerbation d'effet neurotoxique ne semblent pas impliquer l'inhibition des cholinestérases.

De plus, les conditions d'exposition retenues dans ces protocoles expérimentaux ne peuvent se produire dans des conditions normales d'utilisation chez l'homme. En effet, les voies d'administration chez les animaux (sous cutanée, intrapéritonéale) ne reflètent pas les voies d'exposition de l'homme (cutanée, inhalation) et les fortes doses utilisées ne peuvent être atteintes chez l'homme. Par ailleurs, ces études ne sont pas de qualité suffisante pour en déduire des conclusions exploitables dans le cadre de cette saisine.

Enfin, ces études n'ont pas pu conclure sur la nature des interactions des substances testées avec le DEET (additivité, potentialisation, synergie,...) ni sur les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la réponse neurotoxique.

Analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)

L'analyse de cette publication n'a pas pu identifier de manière claire les mécanismes d'action impliqués dans la neurotoxicité du DEET. De plus, cette étude comporte plusieurs biais méthodologiques ne permettant pas toujours de valider les conclusions émises par les auteurs. En effet, les protocoles sont peu détaillés ; il existe des incertitudes sur les doses ; les doses testées sont parfois très différentes les unes par rapport aux autres ce qui limite l'interprétation des résultats et par là même les conclusions ; on observe l'absence de témoins dans certaines études. Enfin, les résultats sont parfois incohérents les uns par rapport aux autres sans justification. Néanmoins, cette étude montre plusieurs effets du DEET :

- une inhibition *in vitro* des acétylcholinestérases de drosophile et humaine, et de la butyrylcholinestérase humaine ;
- un faible effet anticholinestérasique *ex vivo* chez la souris mais à une concentration élevée (500 µM) ne pouvant être atteinte chez l'homme ;
- une faible inhibition des cholinestérases ;
- une faible affinité pour les cholinestérases ($K_d \approx 0,3-10$ mM) comparée à celle d'autres inhibiteurs comme la tacrine, le donepezil, la fasciculine ou le BW284C51.

En résumé, cette étude permet d'avancer des hypothèses sur les mécanismes d'action *in vitro* de la substance DEET seule, mais elles doivent être confirmées *in vivo* aux doses proches de celles auxquelles l'homme pourrait être exposé.

En raison des nombreuses limites liées aux protocoles expérimentaux utilisés dans les études de co-exposition, et en l'absence d'études de co-exposition au DEET et à la deltaméthrine (ainsi qu'aux autres insecticides utilisés en LAV), aucune conclusion ne peut être retenue ni exploitée dans le cas des professionnels de la LAV.

6. CONCLUSIONS DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

L'étude de Corbel *et al.* (2009) montre une faible inhibition des cholinestérases *in vitro* et *ex vivo* (chez la souris) à de fortes concentrations de DEET mais elles doivent être confirmées *in vivo*.

En l'absence de données expérimentales de co-exposition au DEET et à la deltaméthrine, ainsi qu'aux autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV, et en l'absence de connaissance du mécanisme d'action du DEET, il n'a pas été possible de réaliser une évaluation des risques sanitaires liés à la co-exposition des professionnels aux substances d'intérêt retenues dans cette saisine.

Toutefois, il existe quelques études de co-exposition impliquant le DEET associé à d'autres substances insecticides telles que les organophosphorés ou les carbamates, substances différentes de celles utilisées en LAV. Les résultats de ces études montrent que certaines associations, incluant le DEET, induisent une augmentation des effets neurotoxiques par rapport à ceux observés avec les substances seules. Il est à noter que ces études présentent des biais méthodologiques et/ou ont été menées selon des voies et conditions d'exposition différentes de celles auxquelles les professionnels de la LAV sont susceptibles d'être exposés. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, **il n'est pas possible de conclure quant aux interactions potentielles pouvant se produire lors d'une co-exposition au DEET et à la deltaméthrine ni à d'autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV.**

7. RECOMMANDATIONS

L'absence d'études n'a pas permis de conclure sur le risque inhérent à la co-exposition dans les conditions d'utilisation du DEET et des insecticides de LAV chez l'homme. Afin de pouvoir répondre à l'objet de cette saisine, **l'Anses et l'Afssaps estiment que la réalisation d'études permettant de comprendre les mécanismes d'action du DEET et les interactions liées à la co-exposition *in vivo* au DEET et à d'autres substances utilisées en LAV sont nécessaires.**

L'Anses et l'Afssaps rappellent que le DEET permet de se protéger efficacement contre les piqûres de vecteurs de maladies graves (chikungunya, paludisme, dengue ...). Ainsi, toute recommandation ayant pour objectif une restriction d'usage du DEET par les professionnels doit être fondée sur une approche bénéfice/risque, considérant d'une part les connaissances sur la situation épidémique et d'autre part la toxicité de chacune des substances utilisées seules ou en concomitance. A cet effet, la finalisation des évaluations du risque des répulsifs corporels, en cours au niveau européen dans le cadre de la réglementation biocides, pourrait mieux guider ces choix.

Fait en cinq exemplaires,

Le Directeur général de l'Anses



Marc MORTUREUX

Le Directeur général de l'Afssaps



Jean MARIMBERT

DEET

Risques neurotoxiques liés à la co-exposition des professionnels de la lutte antivectorielle au DEET et à d'autres substances insecticides

Saisine Anses n°2009/010

Saisine Afssaps 2009BCT0001

RAPPORT d'expertise collective

**Comité d'experts spécialisés (Anses)
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »**

**Groupe d'experts (Afssaps)
« Evaluation des risques et de l'efficacité de substances et produits biocides »**

Mai 2010

Mots clés

Cholinestérase, co-exposition, deltaméthrine, exposition professionnelle, lutte antivectorielle (LAV), multiexposition, neurotoxicité, N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET), risque cumulé

Modèle SAI FORM 04 (février 2008) • version : test
02.01

Rapport : 27 mai 2010 • version : 1

Présentation des intervenants

RAPPORTEURS

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités, biologie environnementale-écotoxicologie

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Pharmaco-toxicologue

ADOPTION DU RAPPORT PAR LES COMITES D'EXPERTS SPECIALISES

- Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » de l'Anses – 7 janvier, 18 février, 1^{er} avril et 27 mai 2010.

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités, biologie environnementale-écotoxicologie

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Christine CEZARD – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

M. Michel DESLAURIERS – Médecin toxicologue, pôle de toxicologie industrielle

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET – Evalueur de risque en santé environnement

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Pharmaco-toxicologue

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence en sciences de l'environnement et santé publique

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue

M. Luc FONTANA – Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier, Médecine, Santé au travail

Mme Nathalie FOUILHE SAM-LAI – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques. Démission le 1^{er} juillet 2009.

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Dr ès Science, ingénieur chimiste spécialisé en santé au travail

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise

Mme Béatrice LALERE – Docteur en chimie analytique et en environnement

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée de l'INRS

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des universités en dermatochimie

Mme Anne-Christine MACHEREY – Docteur en toxicologie, spécialisée dans la prévention du risque chimique

Mme Florence MENETRIER – Pharmacien, chef de projet dans le domaine de la toxicologie nucléaire, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

M. Daniel PICART – Retraité de l'enseignement et de la recherche en chimie structurale

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Mme Anne STEENHOUT – Chimiste, spécialiste en évaluation intégrée des risques sanitaires

M. Robert TADRIF – Chimiste et toxicologue, spécialisé en santé environnement et santé au travail

M. Eric THYBAUD – Ecotoxicologue.

- Ce rapport a également été soumis pour commentaires au Groupe d'experts « Evaluation des risques et de l'efficacité de substances et produits biocides » de l'Afssaps – 4 février et 8 avril 2010.

Président

M. Jean-Claude LABADIE – Médecin hygiéniste Praticien hospitalier, Maître de conférences des Universités

Membres

M. Ludwig-Serge AHO-GLELE, Médecin hygiéniste Praticien hospitalier en épidémiologie et hygiène hospitalière

Mme Martine AUPEE – Médecin hygiéniste Praticien hospitalier, co-responsable unité d'hygiène, centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales

Mme Armelle BAEZA – Maître de Conférences des Universités en toxicologie

M. Pierre CARNEVALE – Entomologiste médical

M. Dany CHEVALIER – Maître de Conférences des Universités en toxicologie

M. François COUDORE – Professeur des Universités en toxicologie

M. Jacques-Christian DARBORD – Professeur des Universités, Praticien hospitalier en bactériologie

M. Ludovic DEGENTILE – Praticien hospitalier biologiste des hôpitaux, laboratoire de parasitologie-mycologie

M. Jérôme DEPAQUIT – Maître de Conférences des Universités en parasitologie

M. Dominique ERNOUF – Maître de Conférences des Universités en toxicologie

Mme Valérie FESSARD – Chargée de recherche en toxicologie

Mme Marie-Louise GOETZ – Médecin hygiéniste Praticien hospitalier, Maître de Conférences des Universités

M. François HUBERT – Toxicologue

M. Arezki IZRI – Maître de Conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de parasitologie

M. Jean-Claude LABADIE – Médecin hygiéniste Praticien hospitalier, Maître de conférences des Universités

M. Jean-Louis LACOUT – Professeur des Universités en chimie

M. Bruno LEBLAIS – Pharmacien commandant, conseiller technique nouveaux risques biologiques et chimiques

Mme Christine MIELCAREK – Enseignant chercheur, responsable Pôle microbiologie

M. Philippe NIEL – Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier en microbiologie

Mme Nicole ORANGE – Professeur des Universités en microbiologie

Mme Marie Bénédicte ROMOND – Professeur des Universités en microbiologie-virologie

M. Xavier VERDEIL – Médecin hygiéniste Praticien hospitalier en épidémiologie et hygiène hospitalière

Mme Delphine VERJAT – Pharmacien hygiéniste Praticien hospitalier, centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales

Après prise en compte des commentaires, le rapport a été approuvé par les rapporteurs.

Il a été adopté par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » le : 27 mai 2010.

COORDINATION SCIENTIFIQUE

Mme Stéphanie ALEXANDRE – Chef de l'Unité Expologie de la Direction des Produits Réglementés – Anses

Mme Céline HUYNH-DELERME - Evalueur Toxicologue de l'Unité de l'Evaluation Toxicologique et Microbiologique, Direction de l'Evaluation de la Publicité, des Produits Cosmétiques et Biocides (DEPPCB) – Afssaps

M. Mostafa OULD ELHKIM – Chef de l'Unité de l'Evaluation Toxicologique et Microbiologique, Direction de l'Evaluation de la Publicité, des Produits Cosmétiques et Biocides (DEPPCB) – Afssaps

Mme Nessryne SATER – Chargée de Projets Scientifiques du Département Réglementation Chimie Europe – Anses / Evalueur Toxicologue de l'Unité de l'Evaluation Toxicologique et Microbiologique, Direction de l'Evaluation de la Publicité, des Produits Cosmétiques et Biocides (DEPPCB) – Afssaps

M. Ohri YAMADA – Chef de Projets Scientifiques de la Direction Santé Environnement Travail – Anses

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE

Mme Sandrine CHARLES – Chef de Projets Scientifiques de l'Unité Toxicologie de la Direction des Produits Réglementés – Anses

SECRETARIAT ADMINISTRATIF

Mme Martine BELLERY – Afssaps

Mme Arlette VILLETTE – Anses

Remerciements

Pour leur collaboration (transmission des protocoles de traitement de lutte antivectorielle et des données de vigilance), des remerciements particuliers sont adressés à :

Mme Agnès CADIVEL (Cire Réunion Mayotte)

Mme Sandrine CHANTILLY (DAES, Conseil Général de la Guyane)

M. Jean-Sébastien DEHECQ (DRASS, Réunion)

M. Patrick RABARISON (SDD, Conseil Général de la Guyane)

M. Philippe SAVIUC (CHU Michallon, Grenoble)

M. Jean-Louis SOLET (Cire Réunion Mayotte)

M. André YEBAKIMA (CD, Conseil Général de la Martinique)

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Expertise collective : synthèse et conclusions	10
Abréviations	15
Liste des figures	16
Liste des tableaux.....	16
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	17
1.1 Contexte.....	17
1.2 Objet de la saisine.....	17
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre (Anses, CES, GT, rapporteurs) et organisation.....	18
2 Concepts et méthodologies utilisés en co-exposition	19
2.1 Introduction	19
2.2 Démarche d'évaluation du risque cumulé.....	19
2.3 Concepts de base.....	20
2.4 Typologie des actions.....	21
2.5 Méthodes d'évaluation du risque cumulé pour les substances ne présentant pas de données d'interaction au sein du mélange	22
2.5.1 Additivité des doses	22
2.5.1.1 Méthode de l'indice de risque (HI).....	22
2.5.1.2 Méthodes du facteur potentiel relatif (RPF) et du facteur d'équivalence toxique (TEF).....	23
2.5.2 Additivité des réponses.....	24
2.6 Méthode d'évaluation du risque cumulé pour les substances présentant des interactions ou méthode du « weight of evidence »	24
2.7 Conclusions concernant l'applicabilité des méthodes d'évaluation du risque afférant à la multiexposition.....	26
3 Choix des substances à étudier	27
4 Profil toxicologique de la deltaméthrine	29
4.1 Données issues du rapport d'évaluation biocide européen et de la littérature scientifique	29
4.1.1 Généralités.....	29
4.1.2 Données toxicocinétiques	29
4.2 Données de neurotoxicité de la deltaméthrine	31
4.2.1 Etudes chez l'animal	31
4.2.1.1 Neurotoxicité aiguë.....	31
4.2.1.2 Neurotoxicité après administration répétée	31
4.2.2 Données chez l'homme	31

4.3 Mécanismes d'action de la deltaméthrine	32
4.3.1.1 Actions sur les canaux voltage-dépendants	32
4.3.1.2 Autres actions.....	32
4.4 Evaluation du risque lié à l'utilisation de la deltaméthrine en LAV	33
5 Profil toxicologique du DEET.....	34
5.1 Données issues du rapport d'évaluation biocide européen et de la littérature scientifique	34
5.1.1 Généralités.....	34
5.1.2 Données toxicocinétiques.....	34
5.2 Données de neurotoxicité du DEET	36
5.2.1 Données de neurotoxicité chez l'animal	36
5.2.1.1 Neurotoxicité aiguë.....	36
5.2.1.2 Neurotoxicité après administration répétée	36
5.2.2 Données chez l'homme	37
5.2.3 Mécanismes d'action	37
5.3 Evaluation du risque pour une utilisation du DEET seul.....	38
6 Etudes de co-exposition du DEET avec d'autres substances insecticides/pesticides.....	39
6.1 Analyse critique de l'étude de Corbel <i>et al.</i> (2009).....	39
6.1.1 Introduction	39
6.1.2 Effet insecticide du DEET à l'échelle des individus	39
6.1.2.1 Toxicité tarsale du DEET.....	39
6.1.2.2 Toxicité de contact du DEET	40
6.1.3 Effets neurophysiologiques du DEET sur des préparations neuronales d'insectes et de mammifères	40
6.1.3.1 Etude sur la blatte	40
6.1.3.2 Etude chez la souris	40
6.1.4 Caractérisation de l'inhibition des cholinestérases par le DEET	41
6.1.4.1 Inhibition des cholinestérases par le DEET	41
6.1.4.2 Effet du DEET sur l'inhibition de l'AChE par le propoxur.....	43
6.1.4.3 Fixation du DEET sur les sites périphérique et catalytique des ChE.....	43
6.1.4.4 Docking du DEET sur le site catalytique des acétylcholinestérases humaines	44
6.1.5 Interaction entre le DEET et les substances anticholinestérasiques.....	45
6.1.5.1 Toxicité conjointe du DEET et du propoxur	45
6.1.5.2 Approche électrophysiologique chez la blatte	45
6.1.5.3 Approche électrophysiologique chez la souris.....	45
6.1.6 Conclusions de l'analyse critique de l'étude de Corbel <i>et al.</i> (2009).....	46
6.2 Autres études de co-exposition avec le DEET	46
6.2.1 Substances utilisées dans les études de co-exposition avec le DEET	46
6.2.2 Etudes de co-exposition.....	48
6.3 Conclusions concernant les études de co-exposition	49
7 Eléments de discussion, conclusions et recommandations	50
7.1 Discussion et conclusions	50
7.2 Recommandations et perspectives	50

8	Bibliographie : publications, rapports, ouvrages et thèses	52
	ANNEXES	56
	Annexe 1 : Lettres de saisine.....	57
	Annexe 2 : Suivi des mises à jour du rapport.....	60
	Annexe 3 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine	61
	Annexe 4 : Critères de neurotoxicité	68

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives à l'évaluation du potentiel neurotoxique d'une co-exposition des professionnels au DEET et aux insecticides utilisés pour la lutte antivectorielle

Ce document synthétise les travaux du Comité d'experts spécialisés et des rapporteurs.

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie le 16 novembre 2009 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale du travail (DGT), afin de réaliser une analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)¹, et d'en apprécier sa portée en ce qui concerne d'éventuelles co-expositions, principalement des agents de la lutte antivectorielle (LAV), au N,N-diéthyl-m-toluamide (DEET) et à d'autres substances actives (insecticides en particulier), actuellement utilisées ou potentiellement utilisables, ayant une action anticholinestérasique (organophosphorés et carbamates notamment) ou sur le système de neurotransmission cholinergique.

Dans le cadre de cette saisine, l'Afsset s'est intéressée uniquement à la problématique de co-expositions des travailleurs de la LAV durant les opérations de pulvérisation d'insecticides.

Contexte

La lutte contre les insectes vecteurs de maladies telles que le chikungunya, la dengue ou le paludisme constitue un véritable enjeu de santé publique en France, principalement dans les régions d'outre-mer. En absence de vaccins ou de traitements thérapeutiques, le recours aux insecticides et aux répulsifs corporels, reste le seul moyen de lutte contre la transmission des agents pathogènes.

Dans ce cadre, les professionnels de la LAV peuvent s'appliquer des répulsifs corporels tels que le DEET, pour repousser les moustiques vecteurs, pendant ou dans les heures précédant ou suivant les opérations de pulvérisation d'insecticides.

Habituellement, les substances chimiques sont évaluées de manière individuelle. Cependant, lorsque l'exposition à plusieurs substances peut être simultanée, il est dans ce cas pertinent de s'assurer d'une absence d'interaction. L'hypothèse avancée par Corbel *et al.* (2009) selon laquelle le DEET est un inhibiteur potentiel des cholinestérases, supposerait qu'en cas de multi-exposition aux insecticides utilisés dans le cadre de LAV et agissant par les mêmes mécanismes d'action, un risque de potentialisation de la neurotoxicité pourrait être envisagé.

Pour rappel, dans le cadre de la réglementation européenne relative aux biocides, l'inscription à l'annexe I de la Directive 98/8/CE du DEET en tant que répulsif corporel (TP 19) a été votée par les Etats-membres en mars 2010.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'experts spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine. Par ailleurs, le Groupe d'experts (GE) « Evaluation des risques et de l'efficacité de substances et produits biocides » de l'Afssaps a

¹ Corbel V., Stankiewicz M., Pennetier C. *et al.* (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biology* 7: 47.

• Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 M@l afsset@afssset.fr
www.afssset.fr

également pris part à l'instruction. Les coordinateurs de la saisine des deux agences appuyés par trois rapporteurs du CES ont été chargés de la préparation du rapport d'expertise.

Les travaux ont été soumis régulièrement au CES, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport d'expertise tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les critères de compétence, d'indépendance et de transparence, tout en assurant la traçabilité.

Description de la méthode

Choix des insecticides d'intérêt pour l'évaluation d'une co-exposition avec le DEET

L'étude d'interaction potentielle entre plusieurs substances est difficile à mettre en œuvre dans la plupart des cas. Elle ne peut être effectuée que pour des substances ayant des mécanismes d'action communs ou similaires. Le DEET étant suspecté d'être un inhibiteur potentiel des cholinestérases, cet effet devrait être considéré dans le choix des insecticides à sélectionner. Mais il a semblé opportun d'élargir le choix des substances aux neurotoxiques, quel que soit leur mode d'action.

Par ailleurs, seules les substances qui sont effectivement employées ou potentiellement utilisables en LAV et donc qui peuvent être utilisées en concomitance avec le DEET, seront considérées comme d'intérêt à cette étape.

Etudes de l'interaction potentielle en cas de co-exposition

Les études toxicologiques mettant en œuvre la co-exposition aux substances d'intérêt restent à ce jour le seul moyen d'étudier les interactions possibles. Ainsi, pour répondre à cette saisine, une recherche bibliographique exhaustive a été effectuée.

En absence de données expérimentales, l'évaluation du risque lié à la co-exposition à plusieurs substances est théoriquement fondée sur l'identification de substances présentant des mécanismes d'action communs ou similaires ou ayant le même organe cible. Les concepts disponibles sont issus de ceux proposés par l'US EPA (United States Environmental Protection Agency, 2000) et l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2001).

Afin d'étudier la faisabilité de ces concepts, il a été nécessaire d'effectuer en premier lieu :

- une revue des données toxicologiques disponibles relatives aux mécanismes impliqués dans la neurotoxicité du DEET et des insecticides pouvant agir par des mécanismes d'action communs ou similaires ou ayant les mêmes cibles,
- une analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009) afin de vérifier l'hypothèse avancée par les auteurs selon laquelle le DEET est un inhibiteur des cholinestérases et qu'il interagit avec d'autres substances anticholinestérasiques ou ayant une action sur le système de neurotransmission cholinergique.

Résultat de l'expertise collective

Choix des insecticides d'intérêt pour l'évaluation d'une co-exposition avec le DEET

Plusieurs insecticides peuvent moduler négativement l'acétylcholinestérase de manière :

- directe : les carbamates (bendiocarbe) et les organophosphorés (téméphos, malathion),
- indirecte ou secondaire : les pyréthrinoides de synthèse tels que la deltaméthrine et la perméthrine (par action sur les canaux de sodium), le spinosad (agoniste de l'acétylcholine), l'étofenprox (pseudopyréthrinoides) et l'indoxacarbe (par action sur la transmission axonale et sur les canaux sodiques).

Concernant l'exposition des professionnels aux insecticides, elle est plus importante pour les insecticides à usage adulticide, destinés à une pulvérisation spatiale, que pour les insecticides à usage larvicide. Les principaux insecticides actuellement utilisés dans la LAV sont la deltaméthrine pour les traitements adulticides et le Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) pour

les traitements larvicides. Le téméphos (larvicide) et le malathion (adulticide) peuvent encore être exceptionnellement utilisés. Le pyriproxyfène et le spinosad sont à l'étude pour être utilisés en traitement larvicide.

Le Bti, au vu de son mode d'action (perforation de la paroi du tube digestif), n'a pas *a priori* d'effets neurotoxiques. L'intérêt de considérer les organophosphorés a été jugé faible étant donné que cette famille de substances ne sera bientôt plus disponible pour des usages de LAV.

Au final, seule la deltaméthrine est effectivement utilisée dans le cadre de la LAV et dispose d'études montrant des effets neurotoxiques chez les animaux de laboratoire comme chez l'homme.

Etudes disponibles de co-exposition impliquant le DEET

Il n'existe actuellement pas d'études expérimentales de co-exposition au DEET et aux substances utilisées ou potentiellement utilisables en LAV. Cependant, outre l'étude de Corbel *et al.* (2009), quelques études de co-exposition du DEET avec des substances neurotoxiques sont disponibles, notamment celles réalisées pour expliquer les effets observés chez les soldats américains après leur retour aux Etats-Unis, appelés aussi « syndrome de la guerre du Golfe ». Les substances qui ont été étudiées sont le bromure de pyridostigmine (médicament), le chlorpyrifos (insecticide organophosphoré non utilisé en LAV), la perméthrine (insecticide pyréthroïde de synthèse non utilisé en LAV) et le propoxur (insecticide carbamate non utilisé en LAV). Une des hypothèses avancées pour expliquer ce syndrome est la co-exposition à ces substances neurotoxiques.

L'analyse de ces études toxicologiques de co-exposition avec le DEET et d'autres études neurotoxicologiques a pu montrer une augmentation des effets neurotoxiques chez les animaux, lorsque le DEET est associé à certaines substances. De manière générale, les mécanismes d'action avancés par les différents auteurs pour expliquer cette exacerbation d'effet neurotoxique ne semblent pas impliquer l'inhibition des cholinestérases.

Cependant, les conditions d'exposition retenues dans ces protocoles expérimentaux ne peuvent se produire dans des conditions normales d'utilisation chez l'homme. En effet, les voies d'administration chez les animaux (sous cutanée, intrapéritonéale) ne reflètent pas les voies d'exposition de l'homme (cutanée, inhalation) et les fortes doses expérimentales utilisées ne peuvent être atteintes chez l'homme dans les conditions d'utilisation recommandées avec des protections adaptées (gants, masque, combinaison). De plus, ces études ne sont pas de qualité suffisante pour en déduire des résultats fiables.

Enfin, ces études n'ont pas pu conclure sur la nature des interactions des substances testées avec le DEET (additivité, potentialisation, synergie,...) ni sur les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la réponse neurotoxique.

Analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)

L'analyse de cette publication n'a pas pu identifier de manière claire les mécanismes d'action impliqués dans la neurotoxicité du DEET. De plus, cette étude comporte plusieurs biais méthodologiques ne permettant pas toujours de valider les conclusions émises par les auteurs (protocoles peu détaillés, incertitudes sur les doses, doses testées parfois très différentes les unes par rapport aux autres ce qui limite l'interprétation des résultats et par là même les conclusions, absence de témoins dans certaines études, résultats parfois incohérents les uns par rapport aux autres sans justification). Néanmoins, cette étude montre plusieurs effets du DEET :

- une inhibition *in vitro* des acétylcholinestérases de drosophile et humaine, et de la butyrylcholinestérase humaine ;
- un faible effet anticholinestérasique *ex vivo* chez la souris mais à une concentration élevée (500 µM) ne pouvant être atteinte chez l'homme ;
- une faible inhibition des cholinestérases ;
- une faible affinité pour les cholinestérases ($K_d \approx 0,3-10$ mM) comparée à celle d'autres inhibiteurs comme la tacrine, le donepezil, la fasciculine ou le BW284C51.

En résumé, cette étude permet d'avancer des hypothèses sur les mécanismes d'action *in vitro* de la substance DEET seule, mais elles doivent être confirmées *in vivo* aux doses proches de celles auxquelles l'homme pourrait être exposé.

En raison des nombreuses limites liées aux protocoles expérimentaux utilisés dans les études de co-exposition, et en l'absence d'études de co-exposition au DEET et à la deltaméthrine (ainsi qu'aux autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV), aucune conclusion ne peut être retenue ni exploitée dans le cas des professionnels de la LAV.

Conclusions de l'expertise collective

L'étude de Corbel *et al.* (2009) rapporte une faible inhibition des cholinestérases *in vitro et ex vivo* (chez la souris) à de fortes concentrations de DEET.

En l'absence de données expérimentales de co-exposition au DEET et à la deltaméthrine, ainsi qu'aux autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV, et en l'absence de connaissance du mécanisme princeps d'action du DEET, il n'a pas été possible de réaliser une évaluation des risques sanitaires liés à la co-exposition des professionnels au DEET et aux insecticides utilisés dans la LAV.

Toutefois, il existe quelques études de co-exposition impliquant le DEET associé à des composés organophosphorés ou des carbamates, substances différentes de celles utilisées en LAV. Les résultats de ces études montrent que certaines associations, incluant le DEET, induisent une augmentation du potentiel neurotoxique par rapport à l'action des substances seules. Il est à noter que ces études présentent des biais méthodologiques et/ou ont été menées selon des conditions d'exposition différentes de celles auxquelles les professionnels de la LAV sont soumis. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, **il n'est pas possible de conclure quant aux effets induits par une co-exposition au DEET et à la deltaméthrine ainsi qu'à d'autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV.**

En conclusion, l'étude de Corbel *et al.* (2009) ainsi que les autres données disponibles dans la littérature n'apportent pas d'éléments nouveaux nécessitant de modifier les recommandations en vigueur d'utilisation du DEET.

Recommandations

L'absence d'études de co-exposition n'a pas permis de conclure sur le risque inhérent à la co-exposition dans les conditions d'utilisation du DEET et des insecticides de LAV chez l'homme. **Les experts recommandent donc la réalisation d'études permettant de connaître le mécanisme de l'action du DEET et les effets liés à la co-exposition *in vivo* au DEET et à d'autres substances neurotoxiques utilisées en LAV, afin de mieux documenter les mécanismes d'actions et les interactions de ces substances.**

Pour rappel, le Haut conseil de la santé publique recommande que les répulsifs corporels soient appliqués uniquement sur les parties découvertes pour éviter des conditions d'occlusion favorables à une augmentation de l'absorption cutanée. Ainsi, l'application du DEET sous les équipements de protection des professionnels de la LAV (combinaison, masque, gants) utilisés lors des traitements est déconseillée car elle aboutirait à des conditions d'occlusion, et par conséquent favoriserait l'absorption cutanée du DEET. Le respect de ces recommandations d'utilisation du DEET exclut donc toute exposition simultanée du DEET avec des insecticides. De plus, le matériel préconisé pour les professionnels lors des opérations de LAV semble assurer une protection efficace contre les piqûres d'insectes.

Par ailleurs, le CES rappelle que le DEET permet aux opérateurs de la LAV de se protéger efficacement contre les piqûres de vecteurs de maladies graves (chikungunya, paludisme, dengue) auxquelles ils sont particulièrement exposés dans l'exercice de leur profession. En conséquence, toute décision quant à l'utilisation du DEET par ces professionnels devra être prise en considérant le rapport bénéfice/risque d'une restriction d'usage.

Enfin, bien que des campagnes de sensibilisation sur les risques d'exposition aux dérivés de pulvérisation d'insecticides soient effectives en population générale, le CES attire l'attention sur

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine « DEET »

les possibilités pour les populations présentes à proximité des zones traitées, en particulier les enfants, d'être exposées de façon indirecte et accidentelle à des substances utilisées pour la LAV alors qu'elles peuvent s'être appliquées des répulsifs cutanés par ailleurs. Il serait pertinent d'étudier, pour ces groupes de population, les risques sanitaires éventuels associés à de telles co-expositions dans les cas particuliers où l'information sur l'utilisation de ces substances ne serait pas parvenue à leur connaissance.

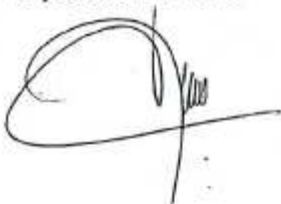
Dans l'attente des résultats d'études permettant de mieux appréhender le risque de co-exposition, le CES propose de se rapporter aux recommandations de l'Afssaps et aux campagnes de sensibilisation sur la conduite à tenir lors des opérations de LAV.

Le Comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations, objets du présent rapport lors de sa séance du 27 mai 2010 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afssset.

Maisons-Alfort, le 27 mai 2010

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES



Abréviations

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

AEL : Acceptable Exposure Level

Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Anses : Agence de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BALC : N,N-diéthyl-m-hydroxyméthylbenzamide

BEH : Bulletin épidémiologique hebdomadaire

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BINWOE : Binary Weight Of Evidence

Bti : *Bacillus thuringiensis var israelensis*

BuCh : Butyrylcholine

BuChE : Butyrylcholinestérase

CES : Comité d'experts spécialisés

ChE : cholinestérases

CYP 450 : Cytochrome P 450

DEET : N,N-diéthyl-m-toluamide

DGPR : Direction générale de la prévention des risques

DGS : Direction générale de la santé

DGT : Direction générale du travail

DL₅₀ : Dose entraînant 50% de mortalité

DSET : Dose sans effet toxique de référence = NOAEL

ET : N-ethyl-m-toluamide

HI : Hazard Index

HQ : Hazard Quotient

IRD : Institut de recherche pour le développement

LAV : Lutte antivectorielle

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level = DSET

NOEL : No Observed Effect Level

PA : Potentiel d'action
PB : Bromure de pyridostigmine
PPSE : Potentiel post-synaptique excitateur
RfC : Reference Concentration
RfD : Reference Dose
RPF : Relative Potency factor
SNP : Système nerveux périphérique
SNC : Système nerveux central
TEF : Toxic Equivalency Factor
US EPA : United States Environmental Protection Agency
WOE : Weight Of Evidence

Liste des figures

Figure 1 : Schéma récapitulatif de la démarche d'évaluation du risque cumulé (d'après ATSDR, 2004a) __	20
Figure 2 : Structure moléculaire de la deltaméthrine _____	29
Figure 3 : Voies métaboliques de la deltaméthrine chez les mammifères (d'après IPCS, 1990) _____	30
Figure 4 : Structure moléculaire du DEET _____	34
Figure 5 : Voies de métabolisation du DEET (d'après ATSDR, 2004b) _____	35
Figure 6 : Effet du DEET sur les cholinestérases _____	42
Figure 7 : Effet de la dilution d'une enzyme inhibée sur l'activité enzymatique. _____	43
Figure 8 : Mécanisme de la formation d'un intermédiaire tétraédrique. _____	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Typologie des (inter)actions (d'après U.S. EPA, 2000a) _____	21
Tableau 2 : Critères d'interprétation de l'indice de risque (HI) (d'après ATSDR, 2004a) _____	23
Tableau 3 : Détermination du facteur BINWOE : critères d'évaluation des interactions entre les couples de substances d'un mélange (d'après ATSDR, 2004a et Mumtaz et Durkin, 1992) _____	25
Tableau 4 : Mécanismes de toxicité de la deltaméthrine et cibles tissulaires/cellulaires/moléculaires chez les mammifères (d'après Ray et Fry, 2006) _____	33

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

La lutte contre les insectes vecteurs de maladies telles que le chikungunya, la dengue ou le paludisme constitue un véritable enjeu de santé publique en France, principalement dans les régions d'outre-mer. En absence de vaccins ou de traitements thérapeutiques, le recours aux insecticides et aux répulsifs corporels, reste le seul moyen de lutte contre la transmission des agents pathogènes.

Dans ce cadre, les professionnels de la LAV peuvent s'appliquer des répulsifs corporels tels que le DEET, pour repousser les moustiques vecteurs, pendant les opérations de pulvérisation d'insecticides.

Habituellement les substances chimiques sont évaluées de manière individuelle. Cependant, lorsque l'exposition à plusieurs substances peut être simultanée, il est dans ce cas pertinent de s'assurer d'une absence d'interaction. L'hypothèse avancée par Corbel *et al.* (2009) selon laquelle le DEET est un inhibiteur potentiel des cholinestérases, supposerait qu'en cas de multi-exposition aux insecticides utilisés dans le cadre de LAV et agissant par les mêmes mécanismes d'action, un risque de potentialisation de la neurotoxicité pourrait être envisagé.

Suite à la publication de Corbel *et al.* (2009), la Direction générale de la santé (DGS) a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) le 12 août 2009 pour qu'elle évalue si les résultats de cette étude étaient susceptibles de modifier les recommandations aux voyageurs publiées dans les Bulletins épidémiologiques hebdomadaires (BEH). L'Afssaps a rendu son avis le 4 janvier 2010 et a conclu que l'étude de Corbel *et al.* (2009) n'était pas de nature à modifier l'évaluation du DEET et par là même, les recommandations aux voyageurs.

Pour rappel, dans le cadre de la réglementation européenne relative aux biocides, l'inscription du DEET à l'annexe I de la Directive 98/8/CE en tant que répulsif corporel (TP 19) a été votée par les Etats-membres en mars 2010.

1.2 Objet de la saisine

L'Afssaps a été saisie le 12 août 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) et l'Afssset (dont les missions ont été reprises par l'Anses depuis le 1^{er} juillet 2010) le 16 novembre 2009 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) et la Direction générale du travail (DGT), afin de réaliser une analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009), et d'en apprécier sa portée en ce qui concerne d'éventuelles co-expositions, principalement des agents de la LAV, au DEET et à d'autres substances actives (insecticides en particulier), actuellement utilisées ou potentiellement utilisables, ayant un effet anticholinestérasique (organophosphorés et carbamates notamment).

Le risque redouté est une exacerbation des effets toxiques respectifs du DEET et des insecticides, auquel cas leur utilisation simultanée serait à proscrire. Ainsi, l'objet de cette saisine concerne essentiellement l'étude des mécanismes d'action neurotoxique des différentes substances chimiques dans le but d'évaluer la nature de leurs interactions.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre (Anses, CES, GT, rapporteurs) et organisation

L'Anses a confié au Comité d'experts spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine. Le DEET ainsi que les insecticides de LAV étant par ailleurs évalués dans le cadre de la réglementation biocides, le CES « Evaluation des risques liés aux substances et produits biocides » de l'Anses a également été tenu informé de l'avancement des travaux.

Lors de la phase d'analyse de la saisine, une présentation de la demande formulée a été organisée lors de la séance plénière du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » du 7 janvier 2010. A l'issue de la présentation réalisée, le CES a donné un avis favorable à l'instruction de cette saisine. Par ailleurs, la saisine a fait l'objet d'une présentation pour information au CES « Evaluation des risques liés aux substances et produits biocides » lors de sa séance plénière du 11 février 2010.

De son côté, l'Afssaps s'est appuyée sur son Groupe d'experts « Evaluation des risques et de l'efficacité de substances et produits biocides ».

Les travaux ont été conduits par l'Anses et l'Afssaps avec l'appui scientifique de rapporteurs membres du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » de l'Anses, sans création de groupe de travail. Les rapporteurs ont été sollicités au sein du CES lors de la séance du 7 janvier 2010. Ils ont été désignés par décision du Directeur général de l'Anses, en date du 5 février 2010. Leur mandat portait sur :

- la rédaction d'une analyse critique de l'étude de *Corbel et al.* (2009) ;
- une participation à la validation de la démarche méthodologique relative au choix des molécules à intégrer dans l'évaluation, au choix des paramètres toxicologiques à prendre en compte dans la comparaison des molécules, à l'utilisation de ces paramètres dans le modèle d'évaluation d'un potentiel de multiexposition ;
- l'appréciation de la portée de l'étude *Corbel et al.* (2009) en ce qui concerne les expositions multiples auxquelles peuvent être soumis les professionnels de la lutte antivectorielle manipulant d'autres substances actives ayant également un effet anticholinestérasique ;
- une relecture du rapport final.

Par courrier en date du 17 février 2010, l'Afssaps a transmis le contrat d'expertise de cette saisine à la DGS, à la DGPR et à la DGT.

Les travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

2 Concepts et méthodologies utilisés en co-exposition

2.1 Introduction

L'homme est constamment exposé, de façon simultanée, à de nombreuses substances chimiques potentiellement toxiques, *via* son environnement et son alimentation.

L'un des principes admis en toxicologie est qu'une exposition séquentielle ou simultanée à une ou plusieurs substances peut modifier la réponse observée lors de l'exposition à ces substances seules (Ottoboni, 1984). Ainsi, la réponse physiologique obtenue après exposition à un mélange de substances peut être différente de la réponse observée après exposition aux substances seules.

Très tôt, les scientifiques se sont intéressés à cette problématique. Cependant, bien que les chercheurs et les instances réglementaires reconnaissent la nécessité d'évaluer le risque cumulé, les progrès sont lents dans ce domaine considérant le manque de données expérimentales sur les mélanges de substances, le manque de connaissances des mécanismes d'action et les limites techniques.

Les autorités réglementaires se sont attachées à publier des recommandations sous forme de guides dans le but d'appréhender cette question. En 1986, l'agence américaine pour la protection de l'environnement, l'U.S. EPA, a été le premier organisme réglementaire à avoir publié des recommandations concernant l'évaluation du risque cumulé (U.S. EPA, 1986). Ces dernières ont été utilisées par de nombreux organismes réglementaires pour l'évaluation du risque cumulé et ont été mises à jour en 2000 (U.S. EPA, 2000a). En mai 2003, L'U.S. EPA publie un guide « Framework for Cumulative Risk Assessment » (U.S. EPA, 2003) qui constitue les bases de l'évaluation du risque cumulé. De plus, en 2004, l'agence américaine des substances toxiques et du registre des maladies (ATSDR) a repris ces lignes directrices afin de les compléter et de les mettre à jour (ATSDR, 2004a). Enfin, on peut citer l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) qui a travaillé sur les méthodologies d'évaluation du risque cumulé des pesticides (EFSA, 2006). Il est à noter que les approches d'évaluation du risque cumulé sont basées dans une large mesure sur les travaux de Bliss (1939) et Finney (1971) et sont de nature plus mathématique que biologique.

2.2 Démarche d'évaluation du risque cumulé

La démarche d'évaluation du risque cumulé repose sur la disponibilité de données toxicologiques pertinentes. Ainsi, il s'agit au préalable de réunir les données sur les substances constituant le mélange, d'analyser les profils toxicologiques individuels et les études d'interaction possibles, d'identifier les points communs entre les mécanismes, la toxicocinétique et les effets sur la santé pour enfin déterminer la méthode à utiliser et ainsi évaluer le risque cumulé (ATSDR, 2004a). La Figure 1 synthétise la démarche d'évaluation du risque cumulé.

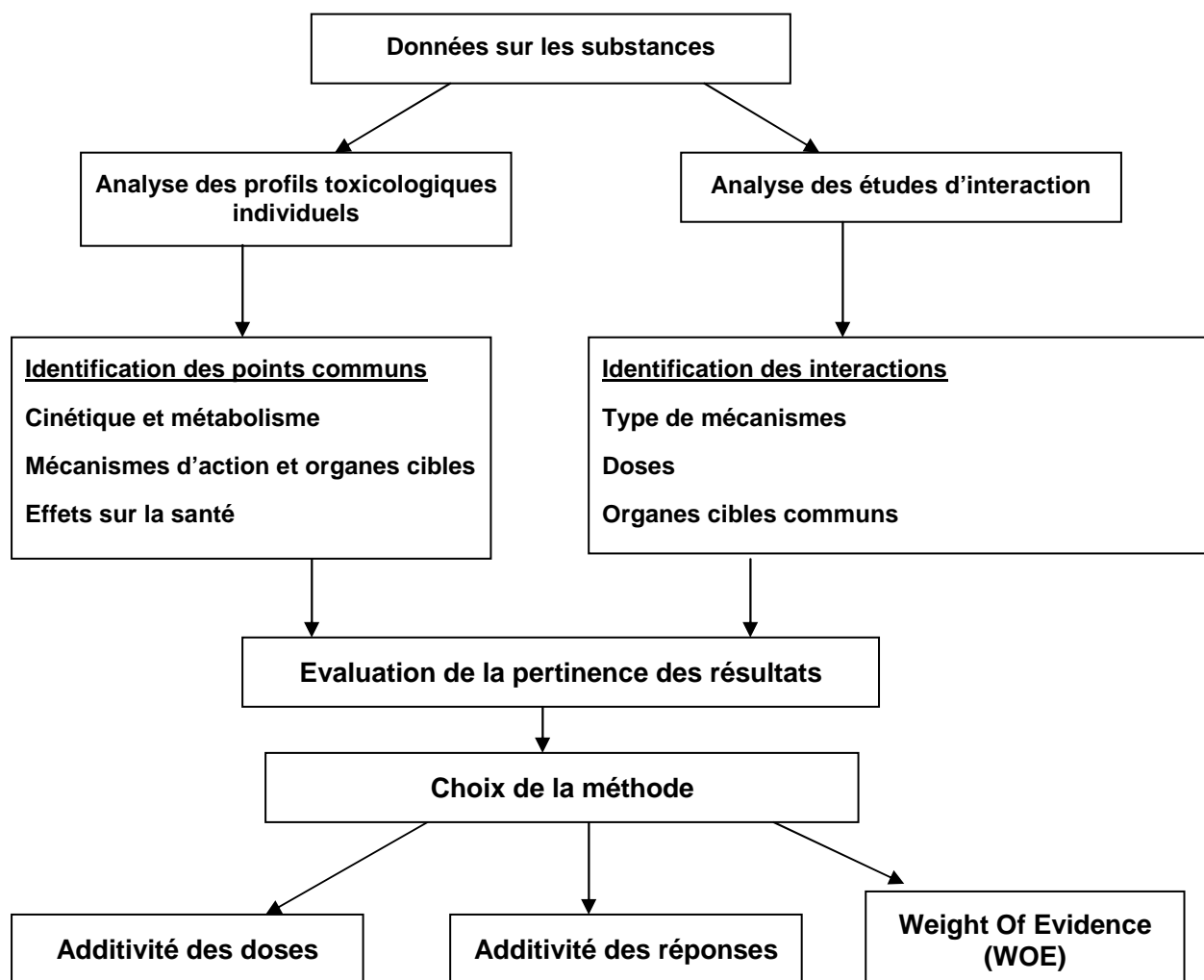


Figure 1 : Schéma récapitulatif de la démarche d'évaluation du risque cumulé (d'après ATSDR, 2004a)

2.3 Concepts de base

L'évaluation du risque cumulé repose sur deux principales approches qui diffèrent en fonction des données disponibles sur le mélange de substances à évaluer. La première approche est à envisager si des données sont disponibles sur le mélange lui-même ou sur un mélange similaire. L'évaluation du risque peut alors être basée sur les données du mélange lui-même ou du mélange similaire. La deuxième approche est à considérer lorsque les compositions des deux mélanges de substances ne sont pas identiquement ou raisonnablement similaires, ou lorsque qu'aucune donnée sur le mélange ou sur un mélange similaire n'est disponible. L'évaluation du risque portera alors sur les propriétés toxicologiques de chaque substance composant le mélange.

2.4 Typologie des actions

Les substances présentes dans un mélange peuvent interagir entre elles selon leur mécanisme d'action, sur la même cible ou non. La présence ou l'absence d'interaction des substances entre elles va définir le type d'évaluation du risque cumulé.

Les différentes actions des substances constituant un mélange peuvent être classées en fonction de la présence ou l'absence d'interactions, mais également en fonction de la nature de ces actions qui peuvent être semblables ou dissemblables (Plackett et Hewlett, 1952). Le Tableau 1 synthétise les termes définissant les actions des substances au sein du mélange.

Tableau 1 : Typologie des (inter)actions (d'après U.S. EPA, 2000a)

Type d'interaction	Effets	Actions	
SANS INTERACTION	Additivité des doses	Actions semblables simples	
	Additivité des réponses	Actions dissemblables simples = actions indépendantes	
AVEC INTERACTION	Synergie	Actions semblables complexes	} Effet > additivité
	Potentialisation	Actions dissemblables complexes	
	Antagonisme	Actions semblables complexes	} Effet < additivité
	Inhibition	Actions dissemblables complexes	

La typologie des actions est définie sur la base du mode d'action des substances dans le mélange et sur leur comportement les unes vis-à-vis des autres. Ainsi, en l'absence de données montrant l'existence d'interactions entre les substances dans le mélange, les effets considérés correspondront soit à une additivité des doses, soit à une additivité des réponses. L'additivité est définie comme un effet du mélange égal à la somme des effets unitaires des substances constituant ce mélange (U.S. EPA, 1986).

On parle d'additivité des doses lorsque les composants du mélange agissent par un même mode d'action et provoquent une réponse commune, les actions sont donc semblables (U.S. EPA, 1986b). En d'autres termes, les composants du mélange se comportent comme des substances plus diluées ou plus concentrées les unes par rapport aux autres, ne différant seulement que par leur potentiel toxique. A l'inverse, on parle d'additivité des réponses lorsque les substances du mélange agissent indépendamment sans interférence et par des modes d'action différents. Les actions sont donc dissemblables ou indépendantes mais conduisent également à un même effet (Bliss, 1939).

En présence de données suggérant une interaction entre les substances d'un mélange, les effets considérés correspondront, soit à des effets supérieurs à ceux observés avec l'additivité, soit à des effets moindres, et différeront donc de la somme des effets individuels. On définit quatre principaux types d'interaction (ATSDR, 2004a) :

- la synergie (renforcement) correspond à la situation qui se produit lorsque l'exposition simultanée à au moins deux substances du mélange provoque des effets qui sont supérieurs à la somme des effets individuels de ces substances ;

- l'antagonisme survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux substances du mélange est moindre que la somme des effets individuels des substances ;
- la potentialisation correspond à un phénomène survenant lorsqu'une substance connue pour ne pas provoquer d'effet induit une augmentation des effets consécutifs à l'exposition à une autre substance ;
- l'inhibition correspond à la situation qui se produit lorsqu'une substance sans effets diminue les effets d'une autre substance quand elles sont combinées (U.S. EPA, 2000a).

Par conséquent, les interactions des substances observées expérimentalement au sein du mélange serviront à établir des hypothèses sur les effets que l'on sera supposé observer *in vivo* consécutivement à l'exposition à ce mélange et par là-même à définir la méthode à utiliser pour l'évaluation du risque cumulé.

2.5 Méthodes d'évaluation du risque cumulé pour les substances ne présentant pas de données d'interaction au sein du mélange

2.5.1 Additivité des doses

Dans la situation idéale, les substances se comportent de manière similaire autant en termes de toxicocinétique (absorption, métabolisme, distribution, élimination) qu'en termes de profils toxicologiques. Dans de tels cas, trois principales méthodes sont utilisées pour procéder à l'évaluation du risque cumulé :

- la méthode de l'indice de risque (Hazard Index : HI),
- la méthode du facteur potentiel relatif (Relative Potency Factor : RPF),
- la méthode du facteur d'équivalence toxique (Toxic Equivalency Factor : TEF) qui constitue un cas particulier de la méthode RPF.

Ces méthodes sont utilisées pour les mélanges constitués de substances présentant le même mécanisme de toxicité ou endommageant le même organe cible.

2.5.1.1 Méthode de l'indice de risque (HI)

L'HI correspond à la somme des quotients de risque (Hazard Quotient : HQ) de chaque substance constituant le mélange (U.S. EPA, 2000a). Il s'agit de déterminer une dose de référence (Reference Dose : RfD) pour la voie orale ou cutanée, ou une concentration de référence (Reference Concentration : RfC) pour la voie respiratoire afin de calculer le quotient de risque qui est égal au rapport du niveau d'exposition de la substance dans le mélange (E_n) sur la RfD ou la RfC (DL_n). Il est donc nécessaire pour utiliser cette méthode d'obtenir au préalable un niveau maximal acceptable correspondant à une valeur toxicologique de référence, pour chaque substance pour l'effet considéré. L'évaluation du risque cumulé porte ici sur la valeur de HI correspondant à la somme des HQ :

$$HI = \sum_{i=1}^n HQ_i = \frac{E1}{DL1} + \frac{E2}{DL2} + \frac{E3}{DL3} + \dots + \frac{En}{DLn}$$

HI = Indice de risque, HQ = Quotient de risque, E_n = Niveau d'exposition de la substance n , DL_n = Dose de référence (voie orale ou cutanée) ou concentration de référence (voie respiratoire)

La méthode de l'indice de risque (HI) est spécifiquement recommandée pour les mélanges composés de substances dont le profil toxicologique est similaire et dont les courbes dose-réponse sont disponibles et parallèles (Teuschler et Hertzberg, 1995). Cette méthode est utilisée pour une voie d'exposition unique et un seul effet toxique. Il est à noter qu'en l'absence de données relatives aux mécanismes d'action et à la toxicocinétique des substances composant le mélange, cette méthode peut être utilisée pour les mélanges de substances endommageant le même organe cible (U.S. EPA, 2000a). Le Tableau 2 synthétise l'interprétation de l'indice de risque.

Tableau 2 : Critères d'interprétation de l'indice de risque (HI) (d'après ATSDR, 2004a)

Critères	Conclusions	Actions à mener
HI < 1 Informations disponibles sur: 1. mécanismes d'action identifiés 2. effets conjoints définis, 3. extrapolation animal-homme	Pas de danger Confiance forte	-
HI < 1 Manque d'informations définition des mécanismes d'action, effets conjoints non définis, extrapolation animal- homme non pertinente	Absence de danger non démontrée Confiance faible	Incertitudes à discuter
HI < 1 Hypothèse d'additivité des doses non validée	Absence de danger non démontrée, en particulier si interaction supposée	Méthode HI non suffisante, développer méthode avec interactions
HI > 1	Augmentation de la toxicité potentielle chez l'homme Pas de relation proportionnelle entre l'augmentation du HI et le risque	Discuter de la cohérence de l'extrapolation du résultat à l'homme : spécificité des effets Incertitudes à discuter
HI > 1 pour plusieurs effets	Augmentation du nombre d'effets tel que HI > 1, d'où augmentation de la toxicité potentielle	Incertitudes et pertinence du calcul à discuter

2.5.1.2 Méthodes du facteur potentiel relatif (RPF) et du facteur d'équivalence toxique (TEF)

L'évaluation du risque relatif aux mélanges composés de substances supposées être similaires en termes de toxicité peut être réalisée à l'aide de la méthode du RPF ou TEF. Cette méthode a été appliquée dans certains cas particuliers comme celui des dioxines par exemple. Cette approche est basée sur l'existence de données toxicologiques pertinentes, notamment en termes de relation dose-réponse. La toxicité relative de chacune des substances est exprimée par rapport à la toxicité d'une substance de référence. La toxicité relative, RPF ou TEF, est une constante déterminée à l'aide des données toxicologiques disponibles. A titre d'exemple, si une substance A est considérée comme ayant une toxicité correspondant à un dixième de celle de la

substance de référence, dans ce cas, le RPF du composé A sera égal à 0,1. Si ce composé A est considéré comme étant aussi toxique que la substance de référence, alors le RPF de A sera égal à 1. L'évaluation de la toxicité cumulée est ensuite réalisée en additionnant les toxicités de chaque substance proportionnellement à leur concentration dans le mélange :

$$TEQs = \sum_{i=1}^n C_i * TEF_i$$

Où C_i est la concentration ou la dose du composé i , et TEF_i correspond au TEF du composé i

Cette méthode exige que de nombreuses conditions soient satisfaites et ne peut être appliquée que dans un nombre restreint de cas (U.S. EPA, 2000a).

2.5.2 Additivité des réponses

Le risque relatif au mélange dans ce cas, correspond à la somme des risques individuels de chaque substance constituant le mélange. Cette approche est utilisée lorsque les composés du mélange agissent indépendamment les uns des autres, c'est-à-dire sur des cibles fonctionnelles différentes. Elle est basée sur le postulat que la présence d'une substance ne tend pas à modifier le comportement ou la toxicité d'une autre substance (ATSDR, 2004). Ces substances agissant sur des cibles différentes conduiront cependant à un effet identique. Il est à noter qu'il est préférable que cette méthode ne soit utilisée que pour des niveaux faibles d'exposition, le risque d'interaction en cas d'expositions fortes étant très élevé. Cette approche peut par exemple être utilisée pour les substances cancérigènes génotoxiques (ATSDR, 2004).

2.6 Méthode d'évaluation du risque cumulé pour les substances présentant des interactions ou méthode du « weight of evidence »

La méthode du « weight of evidence » (WOE) ou poids de la preuve, est actuellement la méthode la plus utilisée pour incorporer les données d'interaction entre les substances. Cette méthode a tout d'abord été proposée par Mumtaz et Durkin (1992) puis reprise par l'ATSDR (2004a). Elle a été conçue en modifiant la méthode de l'indice de risque (décrite précédemment, § 2.5.1.1) et en prenant en compte les données toxicologiques montrant la présence d'interactions entre des couples de substances au sein du mélange à évaluer (Hertzberg *et al.*, 1999). Cette méthode permet d'inclure les données d'interaction à l'indice de risque et ainsi de savoir si ces interactions conduisent à un indice de risque plus élevé ou plus faible que celui calculé pour une simple additivité des doses.

Le principe de cette méthode repose sur l'évaluation de la pertinence des données d'interaction disponibles pour chaque couple de substances possible au sein du mélange. Un facteur BINWOE (Binary Weight Of Evidence) est calculé, correspondant à la prise en compte de critères visant à décrire la nature et l'intensité des interactions entre deux substances (

Tableau 3).

Tableau 3 : Détermination du facteur BINWOE : critères d'évaluation des interactions entre les couples de substances d'un mélange (d'après ATSDR, 2004a et Mumtaz et Durkin, 1992)

Critères de classification	Signe ou valeur attribués au facteur
Nature de l'interaction	Direction de l'interaction
= Additive	0
Plus qu'additive	+1
Moins qu'additive	-1
? Indéterminée	0
Qualité des données	Pondération
<u>Compréhension des mécanismes</u>	
I. Données mécanistiques non ambiguës, interaction caractérisée	1
II. Caractérisation de la direction de l'interaction fiable mais mécanismes ambigus	0,71
III. Caractérisation et interprétation ambiguës, mécanisme commun et types d'interaction non identifiés avec certitude	0,32
<u>Signification toxicologique</u>	
A. La signification toxicologique de l'interaction a été directement démontrée	1
B. La signification toxicologique est déduite d'autres substances similaires	0,72
C. La signification toxicologique de l'interaction n'est pas évidente	0,32
<u>Autres paramètres</u>	
1. Mêmes période et durée d'exposition	1
2. Période et durée d'exposition différents	0,79
a. Données <i>in vivo</i>	1
b. Données <i>in vitro</i>	0,79
i. Voies d'exposition identiques	1
ii. Voies d'exposition différentes	0,79

Le facteur BINWOE permet d'observer l'influence d'une substance sur une autre pour chaque couple de substances au sein du mélange à évaluer.

Il est à noter que cette méthode possède des limites puisqu'elle requiert que des données relatives aux interactions soient disponibles.

2.7 Conclusions concernant l'applicabilité des méthodes d'évaluation du risque afférant à la multiexposition

Les méthodologies d'évaluation du risque cumulé ou risque lié à la multiexposition à plusieurs substances reposent sur trois principaux critères qui correspondent à la caractérisation :

- d'un mécanisme d'action toxique commun,
- d'organes cibles communs,
- et d'effets toxiques communs.

Dans le cadre de cette saisine, il s'agit tout d'abord de procéder au choix des substances à étudier, sur la base des critères communs cités ci-dessus.

3 Choix des substances à étudier

Le DEET, substance active biocide répulsive (type de produit TP19) entrant dans la composition de produits répulsifs corporels, est utilisé par les professionnels de la LAV et présenterait, d'après Corbel *et al.* (2009), des effets neurotoxiques passant par l'inhibition des cholinestérases, mécanisme commun ou proche de celui attribué à certaines substances chimiques insecticides utilisées dans le cadre de la LAV.

En ce qui concerne les cholinestérases, on en distingue deux types (Pharmacorama, 2006) :

- L'**acétylcholinestérase** (AChE), qui est présente dans les tissus nerveux et les globules rouges et qui hydrolyse l'acétylcholine (ACh). Elle est également appelée cholinestérase vraie.
- La **butyrylcholinestérase** (BuChE), qui est présente dans d'autres tissus tels que le cœur et le plasma et qui hydrolyse entre autres, l'acétylcholine (ACh) et la butyrylcholine (BuCh). Elle est également appelée pseudo-cholinestérase.

Les cholinestérases constituent des enzymes clés du système nerveux central (SNC), en raison de leur capacité d'hydrolyse de l'acétylcholine, permettant ainsi la recapture de la choline par les terminaisons cholinergiques. L'ACh constitue le médiateur non seulement des terminaisons nerveuses parasympathiques mais également de la transmission ganglionnaire et neuromusculaire ainsi que de nombreuses synapses du SNC (Pharmacorama, 2006). Ainsi, un défaut d'hydrolyse de l'ACh, par l'intermédiaire d'une inhibition des cholinestérases, entraîne l'accumulation de l'ACh au niveau des synapses nerveuses, aboutissant à un état stable d'hyperexcitabilité des cellules et donc à des signes cliniques de type céphalées, tremblements, salivation, transpiration, pouvant aboutir jusqu'aux convulsions chez certains sujets.

Les substances à retenir pour une évaluation des risques lors d'une co-exposition avec le DEET doivent répondre aux deux critères suivants : une suspicion d'interaction toxicologique eu égard à leur mode d'action et une possibilité d'exposition concomitante avec le DEET. Les récents travaux de Corbel *et al.* (2009) ayant rapporté des effets du DEET sur les cholinestérases, l'intérêt s'est donc porté dans le cadre de cette saisine sur les insecticides ayant des effets directs ou indirects sur les cholinestérases.

Parmi les insecticides existants sur le marché, les substances ayant une action directe sur les cholinestérases sont les carbamates (ex. : bendiocarbe) et les organophosphorés (ex. : téméphos, malathion) qui agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase. D'autres insecticides pourraient indirectement agir sur les cholinestérases : les pyréthrinoïdes de synthèse (ex. : deltaméthrine, perméthrine, ...) dont le mode d'action est l'ouverture des canaux sodiques, le spinosad qui est un agoniste de l'acétylcholine, l'étofenprox qui est une pseudopyréthrinoïde et l'indoxacarbe qui agit sur la transmission axonale.

Dans le cadre de cette saisine, le choix des substances à étudier a été basé sur les données transmises par les professionnels de la LAV des régions d'outre-mer et en particulier, sur les produits larvicides et adulticides actuellement utilisés. Ainsi, les deux principales substances utilisées actuellement dans le cadre de la LAV, en concomitance avec le DEET (dont l'utilisation n'est pas obligatoire mais conseillée pour les professionnels de la LAV) sont le *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti), en tant que larvicide, et la deltaméthrine, en tant qu'adulticide.

Le Bti est considéré comme le larvicide de référence, en raison de son efficacité contre les larves de moustiques et de son innocuité pour les autres insectes, poissons et animaux supérieurs dont l'homme (Afsset, 2007).

La deltaméthrine appartient à la famille des pyréthriinoïdes et peut présenter des effets neurotoxiques en fonction de l'exposition, par un mécanisme différent de celui impliquant l'inhibition des cholinestérases. Le téméphos (larvicide) et le malathion (adulticide) peuvent encore être exceptionnellement utilisés. Enfin, le Bti a potentiellement quelques substituts : le pyriproxifène et le spinosad. Par ailleurs, l'exposition des opérateurs aux insecticides à usage adulticide, destinés à une pulvérisation spatiale est *a priori* plus importante que les insecticides à usage larvicide.

Les substances qui ne sont effectivement pas utilisées en LAV n'ont pas été considérées comme prioritaires. Le Bti n'a pas été retenu car au vu de son mode d'action (perforation de la paroi du tube digestif), il est improbable qu'il ait des effets neurotoxiques. L'intérêt de considérer les organophosphorés a été jugé faible étant donné que cette famille de substances ne sera bientôt plus disponible pour des usages de LAV.

Ainsi, la seule substance qui présente des effets neurotoxiques (voir les critères de neurotoxicité en annexe 4) et qui est effectivement utilisée en LAV, est la deltaméthrine. Cette substance a donc été la seule retenue dans le cadre de cette saisine.

Comme vu précédemment (§ 1.2), l'objet de cette saisine concerne essentiellement l'étude des mécanismes d'action neurotoxique des différentes substances chimiques dans le but d'évaluer la nature de leurs interactions probables.

4 Profil toxicologique de la deltaméthrine

4.1 Données issues du rapport d'évaluation biocide européen et de la littérature scientifique

4.1.1 Généralités

La deltaméthrine appartient à la famille des pyréthrinoïdes de type II. Les substances insecticides, acaricides et produits utilisés pour lutter contre les autres arthropodes entrent dans la catégorie des produits biocides de type 18 tels que définis dans l'annexe V de la directive biocide 98/8/CE. Un rapport d'évaluation biocide réalisé par la Suède est actuellement en cours de discussion au niveau européen mais n'est pas encore finalisé. La partie 'toxicologie' du dossier biocide soumis par le demandeur comporte des études expérimentales chez les animaux de laboratoire, des données chez l'homme, ainsi que des études spécifiques de neurotoxicité et une synthèse des travaux de la littérature.

Les pyréthrinoïdes correspondent à des analogues synthétiques des pyréthrines naturelles et ont été principalement développées au cours des années 1970-1980 (Lautraite et Sargent, 2009). Il existe deux types de pyréthrinoïdes (de type I et de type II). La différence structurale entre ces deux types de molécules est basée sur la présence d'un groupement α -cyano au niveau des pyréthrinoïdes de type II, leur conférant ainsi un potentiel insecticide plus important par rapport à celui des pyréthrinoïdes de type I, appelées également « pyréthrinoïdes non α -cyano » (Lautraite et Sargent, 2009). La deltaméthrine (Figure 2) a été développée en 1974 et constitue le premier pyréthrinoïde contenant un groupement α -cyano (Elliot *et al.*, 1974).

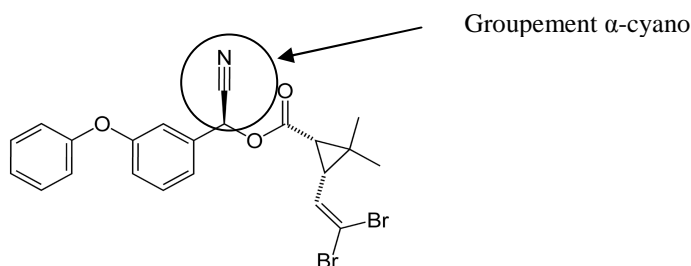


Figure 2 : Structure moléculaire de la deltaméthrine

4.1.2 Données toxicocinétiques

La deltaméthrine est une substance lipophile ($\log P = 4,6$), presque insoluble dans l'eau et soluble dans de nombreux solvants organiques. Ainsi, son absorption dépend de la nature du solvant dans lequel elle sera diluée.

Après administration orale la deltaméthrine est rapidement absorbée par le tractus gastro-intestinal (Roberts and Hutson, 1999) et son absorption est estimée à 75% chez le rat. Administrée par voie orale, la deltaméthrine est rapidement distribuée au niveau des organes et le taux résiduel très faible (2%) se situe principalement au niveau des tissus adipocytaires (Lautraite et Sargent, 2009). L'absorption par voie orale est de 75% (Rapport d'évaluation biocides, 2008).

L'absorption cutanée de la deltaméthrine est très faible et ceci, indépendamment de la formulation. Cette dernière est de 0,23% (Rapport d'évaluation biocides, 2008).

La Figure 3 présente les différentes voies métaboliques de la deltaméthrine chez les mammifères. Les voies majeures de métabolisation de la substance correspondent à des réactions d'oxydation, d'hydrolyse de la fonction ester et de conversion du groupement α -cyano en groupement thiocyanate, aboutissant ainsi à la formation de métabolites inactifs. Une des voies de détoxification passe donc par une hydrolyse de la deltaméthrine par des estérases, posant donc le problème d'une limitation de la dégradation de cette dernière lors de co-exposition avec des inhibiteurs des estérases tels que les organophosphorés (IPCS, 1990).

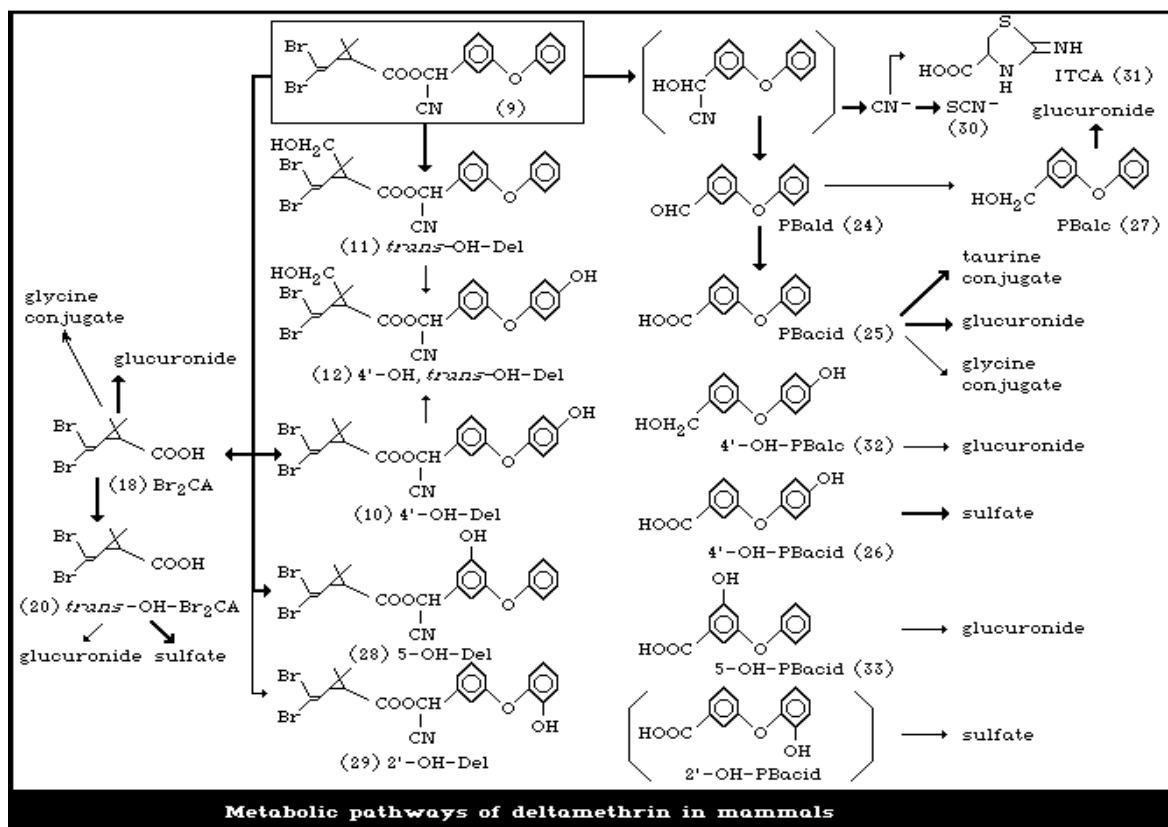


Figure 3 : Voies métaboliques de la deltaméthrine chez les mammifères (d'après IPCS, 1990)

- (9) Deltaméthrine
- (10) 4'-hydroxy-deltaméthrine
- (11) Trans-hydroxy-deltaméthrine
- (12) 4'-hydroxy, trans-hydroxy-deltaméthrine
- (18) Acide 2,2-diméthyl-3-(2,2-dibromyl)cyclopropanecarboxylique
- (20) Acide trans hydroxy-2,2-diméthyl-3-(2,2-dibromyl)cyclopropanecarboxylique
- (24) 3-phénoxybenzaldéhyde
- (25) Acide 3-phénoxybenzoïque
- (26) Acide 3-(4-hydroxyphénoxy)benzoïque
- (27) Alcool 3-phénoxybenzoïque
- (28) 5-hydroxy-deltaméthrine
- (29) 2'-hydroxy-deltaméthrine
- (31) Acide iminothiocarboxylique
- (32) Alcool 3-phénoxybenzoïque
- (33) Acide 3-(5-hydroxyphénoxy)benzoïque

Certains métabolites sont ensuite conjugués, facilitant ainsi leur excrétion urinaire. Les autres métabolites sont éliminés dans les fèces sous forme inchangée (IPCS, 1990).

Le pic de concentration plasmatique apparaît chez l'homme en 1 à 2 heures. La demi-vie d'élimination de la deltaméthrine évaluée chez l'homme lors d'études chez le volontaire sain se situe entre 10 et 11,5 heures. Le taux d'élimination (fécale plus urinaire) chez l'homme est estimé à environ 64-77%, 96 heures après la première administration (IPCS, 1990).

4.2 Données de neurotoxicité de la deltaméthrine

4.2.1 Etudes chez l'animal

4.2.1.1 Neurotoxicité aiguë

Les effets aigus observés après administration orale de la deltaméthrine se manifestent par les signes suivants : hypersalivation, diarrhée, asthénie, altération de la coordination motrice, hypotonie, tremblements, mouvements choréiformes, dyspnée, convulsions. Etant donné les propriétés lipophiles de la deltaméthrine, l'évaluation de ses effets toxiques dépend fortement du véhicule utilisé pour son administration (Lautraite et Sargent, 2009). Des études ont montré que l'administration de la deltaméthrine dans des véhicules tels que les huiles, les émulsions et les solvants organiques augmentait significativement son absorption dans l'organisme (Crofton *et al.*, 1995). Ainsi, les valeurs des DL₅₀ sont dépendantes du solvant co-administré avec la deltaméthrine : DL₅₀ égale à 95 mg/kg de poids corporel (pc) pour des rats mâles et 87 mg/kg pc pour des rats femelles lorsque la deltaméthrine est administrée dans l'huile de maïs ; DL₅₀ supérieure à 5000 mg/kg pc pour des rats mâles et femelles lorsqu'elle est administrée dans un solvant aqueux (Lautraite et Sargent, 2009).

Les effets observés après administration cutanée de deltaméthrine correspondent à des effets irritatifs de type érythème. L'absorption cutanée étant limitée, la probabilité de l'apparition d'effets systémiques reste très faible.

Au niveau de la voie respiratoire, les données disponibles sont relatives à une exposition de la deltaméthrine sous forme de poudre. Or, cette forme galénique n'étant pas présente lors de l'utilisation de la deltaméthrine dans le cadre de la LAV, les données sur cette voie d'exposition ne peuvent donc pas être prises en compte pour cette évaluation de risque.

4.2.1.2 Neurotoxicité après administration répétée

Après administration répétée de la deltaméthrine par voie cutanée, les principaux signes observés sont de type irritatif (Ray et Fry, 2006).

Le rapport d'évaluation biocide (2008) indique que l'exposition par voie orale chez différentes espèces animales pendant plusieurs semaines à plusieurs mois induit une diminution du poids des animaux, ainsi que des effets systémiques de nature neurotoxique tels que : hypersalivation, diarrhée, vomissements, tremblements voire mouvements incontrôlés.

La dose sans effet toxique (DSET) retenue pour les effets neurotoxiques est de 4 mg/kg/jour sur la base d'une étude chez le rat traité pendant 13 semaines.

4.2.2 Données chez l'homme

Les cas d'intoxication à la deltaméthrine restent rares chez l'homme étant donné la mise à disposition d'équipements de protection pour les professionnels de la LAV (Ray et Fry, 2006). Les principaux signes observés après exposition des professionnels sont les suivants : brûlures, prurit, paresthésie des zones exposées et céphalées mais ces signes disparaissent généralement

48 heures après l'exposition. Il est à noter qu'outre le solvant utilisé lors de l'exposition, les concentrations en deltaméthrine influencent également l'apparition des signes cliniques.

Les cas d'intoxication systémique peuvent apparaître en cas de mésusage ou de protection inadéquate. Les signes de l'intoxication à la deltaméthrine peuvent être difficiles à déceler en raison d'une possible confusion avec ceux observés suite à une exposition aux organophosphorés qui induit également des symptômes d'hyperexcitabilité. Le syndrome d'intoxication à la deltaméthrine se manifeste par une choréoathétose associée à une hypersalivation (Ray et Fry, 2006). Cependant, les principaux signes cliniques observés restent des signes cutanés irritants.

Dans un récent rapport (InVS, 2008) dans le cadre du dispositif de surveillance et d'alerte sur les effets sanitaires des produits phytopharmaceutiques et des répulsifs corporels à la Réunion, l'InVS recense 18 cas individuels d'intoxication aux produits phytopharmaceutiques dont :

- 11 avec une présomption moyenne ou forte,
- 9 en relation avec deltaméthrine pulvérisée par une voiture de type 4x4 avec comme signes cliniques : irritations oculaire (7), ORL (5), respiratoire (3) et plus rarement cutanée (1), maux de tête (4), nausées (1), crises d'asthme (3). Concernant les niveaux d'exposition des individus présentant ces signes cliniques, aucune information n'est disponible.

4.3 Mécanismes d'action de la deltaméthrine

4.3.1.1 Actions sur les canaux voltage-dépendants

Le principal mécanisme d'action toxique de la deltaméthrine repose sur son action sur les canaux sodium voltage-dépendant (Ray et Fry, 2006). Les canaux sodium voltage-dépendants correspondent à des fonctions vitales pour la plupart des cellules excitables de l'organisme, car ils permettent l'entrée de sodium à l'intérieur de la cellule et entraînent la production d'un potentiel d'action (PA) (Marban *et al.*, 1998)

Les mammifères sont moins sensibles à la deltaméthrine que les insectes, d'une part en raison d'un système métabolique plus performant que celui des insectes, permettant ainsi l'élimination rapide de la deltaméthrine, d'autre part en raison de la température corporelle des mammifères plus élevée que celle des insectes (les basses températures augmentant les décharges répétées dues à l'action sur les canaux sodium) et enfin en raison d'une sensibilité accrue du canal sodium voltage-dépendants des insectes aux pyréthrinoïdes (Song et Narahashi, 1996). L'action spécifique des pyréthrinoïdes sur les canaux sodium voltage-dépendants correspond au ralentissement des propriétés d'activation et d'inactivation de ces canaux sodium, entraînant ainsi un état stable d'hyperexcitabilité des cellules (Ray et Fry, 2006). En d'autres termes, le ralentissement de l'inactivation des canaux sodium par la deltaméthrine génère une dépolarisation prolongée aboutissant à la production de décharges continues au sein des cellules nerveuses et musculaires (Ray et Fry, 2006). Cet état anormal d'hyperexcitabilité des cellules nerveuses correspond à l'étiologie des syndromes d'intoxication aux pyréthrinoïdes.

4.3.1.2 Autres actions

De nombreuses cibles d'action, autres que les canaux sodium voltage-dépendants, peuvent être impliqués dans l'apparition d'effets neurotoxiques suite à l'exposition aux pyréthrinoïdes (Soderlund *et al.*, 2002). Le Tableau 4 synthétise les différents systèmes avec lesquels la deltaméthrine est susceptible d'interagir et fournit les références de la littérature scientifique dont sont issus les résultats.

Tableau 4 : Mécanismes de toxicité de la deltaméthrine et cibles tissulaires/cellulaires/moléculaires chez les mammifères (d'après Ray et Fry, 2006)

Cible	Concentration	Référence
Phosphorylation protéique	10 ⁻¹³ M	Enan et Matsumura, 1993
Canaux sodium voltage-dépendants	10 ⁻¹⁰ M	Ghiasuddin et Soderlund, 1985
Canaux chlore voltage-dépendant	10 ⁻¹⁰ M	Ray <i>et al.</i> , 1997
Relargage de la noradrénaline	10 ⁻¹⁰ M	Clarck et Brooks, 1989
Dépolarisation membranaire	10 ⁻⁸ M	Eells <i>et al.</i> , 1992
Canaux chlore GABA-dépendants	10 ⁻⁷ M	Lawrence <i>et al.</i> , 1985
Induction de l'apoptose	10 ⁻⁷ M	Wu <i>et al.</i> , 2003a

La nature complexe des effets toxiques des pyréthrinoïdes sur le SNC suggère que ces dernières agissent *via* d'autres mécanismes d'action toxique que celui de la prolongation de l'activation/inactivation des canaux sodium voltage-dépendants. La deltaméthrine diminue le temps d'ouverture des canaux chlore voltage-dépendants, augmentant ainsi l'excitabilité cellulaire (Ray et Fry, 2006). Certaines équipes de recherche émettent l'hypothèse d'une éventuelle action de la substance sur les canaux calcium voltage-dépendants, mais tous concluent à un manque de données pertinentes sur le sujet pour pouvoir réellement incriminer ce mécanisme. La deltaméthrine agirait également par un mécanisme d'inhibition du complexe récepteur GABA-chlore *in vitro*, probablement impliqué dans les convulsions observées après l'exposition à cette substance (Ray et Fry, 2006). Les autres cibles d'action de la deltaméthrine présentées dans le Tableau 4, restent à l'état d'hypothèses par manque de données pertinentes, en particulier, de données *in vivo*.

4.4 Evaluation du risque lié à l'utilisation de la deltaméthrine en LAV

L'évaluation de la deltaméthrine dans le cadre de la réglementation biocides est en cours. Mais l'utilisation de la deltaméthrine en LAV a été évaluée par l'Afsset en 2007 au moment de l'épidémie de chikungunya à la Réunion (Afsset, 2007). L'évaluation des risques a été réalisée selon les guides méthodologiques en vigueur dans les réglementations biocides et phytosanitaires et à partir de données toxicologiques bibliographiques et des protocoles de traitement appliqués par les services réunionnais de LAV pour les données d'exposition.

L'Afsset a conclu que le risque pour les opérateurs est acceptable moyennant le port d'équipements de protection individuelle (combinaison, gants, masque respiratoire). Toutefois, la marge de sécurité est très faible ce qui invite à interpréter les conclusions avec prudence.

Cette évaluation, réalisée dans le cadre spécifique de l'épidémie de chikungunya à la Réunion en 2006, ne préjuge pas de l'évaluation qui sera réalisée dans le cadre de la réglementation biocides.

5 Profil toxicologique du DEET

5.1 Données issues du rapport d'évaluation biocide européen et de la littérature scientifique

5.1.1 Généralités

Le DEET (N,N-diéthyl-méta-toluamide ou N,N-diéthyl-3méthylbenzamide) a tout d'abord été développé pour l'usage militaire en 1946, par le département américain de l'agriculture. Depuis la mise sur le marché de ce composé en 1957, les produits répulsifs cutanés à base de DEET, restent les plus utilisés et les plus efficaces (Katz *et al.*, 2008). Le DEET est une substance active répulsive, à usage cutané, dirigée contre les moustiques, les tiques et autres arthropodes. Les répulsifs corporels, sans action thérapeutique, à appliquer sur la peau saine humaine entrent dans la catégorie des produits biocides de type 19 (répulsifs et appâts) tels que définis dans l'annexe V de la directive biocide 98/8/CE. La substance active a été évaluée au niveau européen et son inscription à l'annexe I de la directive biocides a été votée en mars 2010. La partie « toxicologie » du dossier soumis par le demandeur dans le cadre de la directive biocides, comporte des études expérimentales chez les animaux de laboratoire, des données chez l'homme, ainsi que des études spécifiques de neurotoxicité et une synthèse des études de la littérature tentant d'expliquer les mécanismes d'action impliqués dans la neurotoxicité. De plus, il existe un dossier américain d'enregistrement de la substance établi par l'U.S. EPA (U.S. EPA RED, 1998). Ainsi seront exposées dans cette partie, la synthèse de l'ensemble des données disponibles.

Le DEET entre dans la composition de produits répulsifs corporels, à différentes concentrations. Un produit à une concentration de 15% a été choisi comme produit de référence dans le dossier biocide européen pour réaliser l'évaluation des risques de cette substance. La Figure 4 montre la structure moléculaire du DEET.

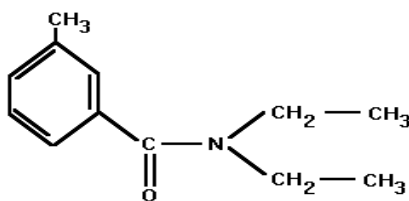


Figure 4 : Structure chimique du DEET

5.1.2 Données toxicocinétiques

Plus de 80% de la quantité administrée de DEET sont absorbés chez le rat traité par voie orale. Lorsqu'il est administré par voie cutanée à des rats, le DEET est absorbé et excrété dans les urines à 74-78%. L'absorption cutanée est plus lente que l'absorption orale. En effet, alors que le pic plasmatique est atteint en moins d'une heure chez des rats traités par voie orale à la dose unique de 200 mg/kg pc, le pic plasmatique est observé plus de quatre heures après le traitement des rats par voie cutanée à la dose de 1000 mg/kg pc. Chez l'homme, les études montrent que moins de 20% du DEET sont absorbés par voie cutanée après 8 heures d'exposition. Ainsi, les cinétiques d'absorption du DEET administré par voie cutanée chez l'animal, ne reflètent pas celles

absorbées chez l'homme, le pic plasmatique après exposition, au 95^{ème} percentile, étant observé chez ce dernier aux alentours de huit heures (Rapport d'évaluation biocide, 2010).

Les données de distribution du DEET dans l'organisme restent très limitées et il semblerait que les résultats des études réalisées chez l'animal ne puissent pas être utilisés pour prédire la distribution chez l'homme (ATSDR, 2004b). En effet d'après le Rapport d'évaluation biocide (2010), le taux d'absorption cutanée apparaît comme étant 4 à 5 fois plus faible chez l'homme que chez le rat.

Le DEET est totalement métabolisé lorsqu'il est administré par voie orale et cutanée. Ainsi, les études disponibles montrent deux voies majeures de métabolisme du DEET. La première voie de métabolisme est une hydroxylation en position méta du groupement méthyle du noyau aromatique, aboutissant ainsi à la formation d'un métabolite, le N,N-diéthyl-m-hydroxyméthylbenzamide (BALC). La deuxième voie de métabolisme implique une réaction de N-désalkylation du groupement N-éthyl, produisant ainsi le métabolite N-éthyl-m-toluamide (ET). D'autres réactions d'oxydation ou d'hydroxylation produisent des métabolites supplémentaires (ATSDR, 2004b). Chez le rat, 74 à 91% du DEET sont excrétés *via* les urines et 3 à 7% *via* les fèces en 48 heures ; 0,21 à 0,67% persistent dans les tissus principalement dans la rate, le foie et les reins. La Figure 5 présente les différentes voies de métabolisation du DEET.

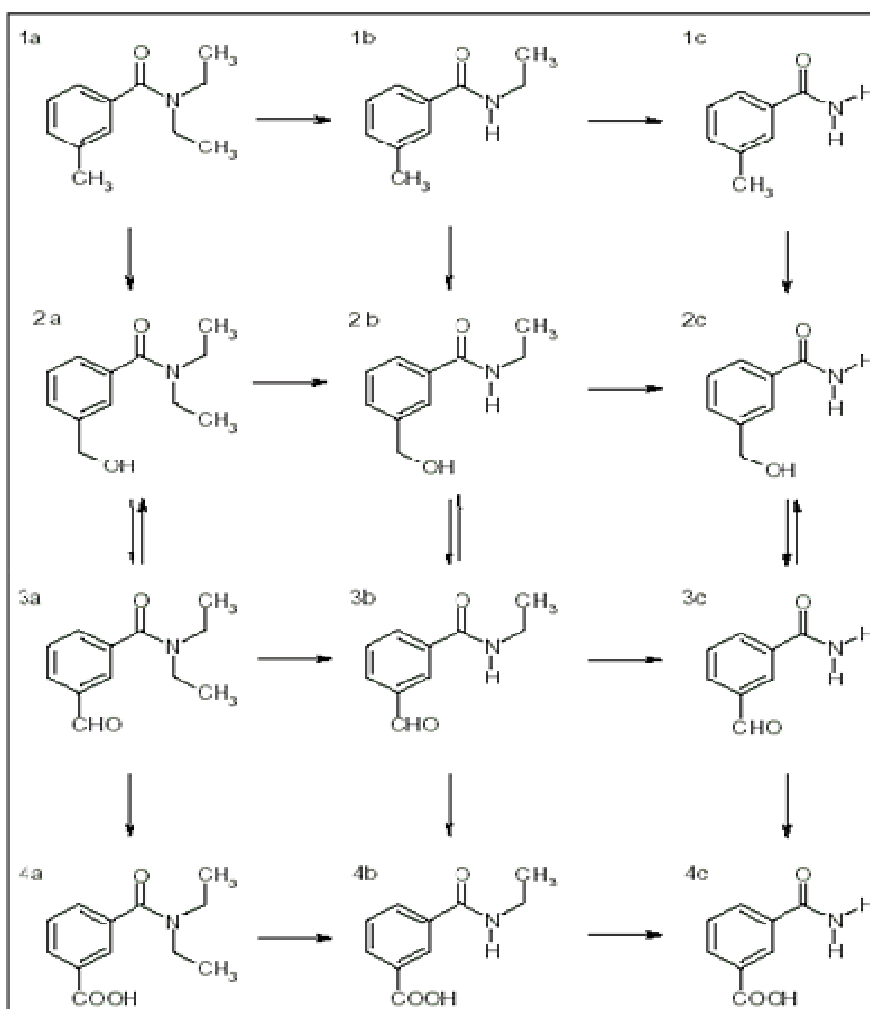


Figure 5 : Voies de métabolisation du DEET (d'après ATSDR, 2004b)

Les lignes horizontales de la Figure 5 représentent les réactions de N-désalkylation et les lignes verticales représentent les réactions d'oxydation. Le métabolite 2a correspond au métabolite BALC et le 1b correspond au métabolite ET.

Chez l'homme, lorsqu'il est appliqué sur la peau, le DEET est absorbé lentement, puis il est complètement métabolisé et excrété rapidement

5.2 Données de neurotoxicité du DEET

5.2.1 Données de neurotoxicité chez l'animal

Les résultats des études présentés dans cette partie du document correspondent à un résumé du rapport d'évaluation de l'U.S. EPA (U.S. EPA RED, 1998) associé aux données issues du rapport européen (Rapport d'évaluation biocide, 2010), mais également des travaux comme ceux d'Antwi *et al.* (2008), relatifs à l'évaluation du risque du DEET.

5.2.1.1 Neurotoxicité aiguë

Une étude chez des rats traités par voie orale aux doses de 0, 50, 200 et 500 mg/kg pc/j pendant 14 jours, a été réalisée. Une heure après le traitement, les rats ont présenté les signes suivants : piloérection, augmentation des vocalises, altération de l'activité motrice et augmentation du temps de réponse à un stimulus thermique à la plus forte dose de 500 mg/kg pc/j. Ces signes cliniques ont disparu 24 heures après le traitement. Aucun signe neurotoxique n'a été observé à la dose de 200 mg/kg pc/j qui constitue le NOEL (Rapport biocide, 2010).

Au niveau de la voie cutanée, une étude de toxicité aiguë chez le chien a été réalisée avec des doses de 356, 1426, 1782 et 7128 mg/kg pc/j (Antwi *et al.*, 2008). Seuls les chiens traités à la plus forte dose ont présenté les signes cliniques modérés suivants : hypersalivation, agitation, incoordination motrice et dépression. Ces signes ont disparu 19 heures après le traitement.

5.2.1.2 Neurotoxicité après administration répétée

L'application cutanée de DEET sur des mini porcs durant 13 semaines, à des doses de 0, 100, 300 et 1000 mg/kg pc, n'a induit aucun signe de toxicité systémique (U.S. EPA RED, 1998).

Dans une étude chez des rats traités par voie cutanée durant 90 jours, utilisant les mêmes doses que celles de l'étude précédente, une NOAEL de 1000 mg/kg pc/j a été retenue (Rapport biocide, 2010).

Abou-Donia *et al.* (2001) ont observé des signes cliniques chez des rats traités avec des applications cutanées de DEET à des doses de 4, 40 et 400 mg/kg pc/j durant 60 jours. Ces auteurs concluent qu'il n'y a aucune différence entre les groupes traités et les groupes témoins négatifs, mais suggèrent qu'aux doses de 40 et 400 mg/kg pc/j il puisse apparaître une diminution de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans certaines régions du cerveau pouvant induire des conséquences physiologiques et pharmacologiques dommageables. Abdel-Rahman *et al.* (2001) ont montré que des modifications histopathologiques pouvaient apparaître après exposition subchronique au DEET (40 mg/kg pc/j) chez le rat, aboutissant à une mort neuronale et à des anomalies cytosquelettiques des neurones survivants, pouvant ainsi compromettre les fonctions du SNC. Cependant, les auteurs précisent que ces effets neurotoxiques n'apparaissent qu'à de fortes doses de DEET.

L'étude de neurotoxicité pertinente retenue dans l'évaluation européenne est celle mettant en œuvre une administration répétée de DEET chez des chiens traités par voie orale à des doses de 0, 50, 100, 200 et 400 mg/kg pc/j durant 8 semaines. Cette étude a été interrompue après

5 jours de traitement en raison des signes cliniques sévères observés aux fortes doses (> 125 mg/kg pc/j). Les signes cliniques observés sont les suivants : mouvements anormaux de la tête, ptyalisme, vomissements, ataxie, tremblements, convulsions. Aucune lésion histopathologique n'a été observée dans les tissus nerveux centraux et périphériques. L'U.S. EPA et le rapport d'évaluation biocides européen (2010) ont retenu une NOAEL de 75 mg/kg pc/j.

Une étude de neurotoxicité chez deux générations de rats a été réalisée. La génération F2 a été exposée *in utero* et durant l'allaitement et a ensuite été exposée 9 mois au DEET par voie orale, aux doses de 500, 2000 et 5000 ppm. Une augmentation de l'activité motrice a été observée à la plus forte dose. Ainsi, l'U.S. EPA (1998) a retenu une NOAEL de 2000 ppm (soit 100 mg/kg pc/j considérant une conversion standard, 20 ppm = 1 mg/kg pc/j) basée sur cet effet neurotoxique et une LOAEL de 5000 ppm (250 mg/kg pc/j).

5.2.2 Données chez l'homme

Commercialisé depuis 1957 et utilisé chaque année par des dizaines de millions de personnes, le DEET constitue l'une des substances actives la plus évaluée en matière de risques sanitaires.

L'effet indésirable rencontré le plus souvent dans les études de vigilance correspond à une irritation cutanée locale se manifestant par un érythème associé à un prurit. Des manifestations cutanées allergiques ont également été rapportées (CCTV, 2007).

Le Comité de coordination de toxicovigilance (CCTV, 2008) fait état de cas montrant des signes neurologiques tels : ataxie, confusion, troubles d'élocution, insomnie, tremblements et convulsions. Ces signes neurologiques ont été rapportés chez l'enfant et chez l'adulte. Une psychose aiguë (adulte), une encéphalopathie (adulte et enfant) ont également été signalées. Dans une revue de 17 publications chez l'enfant, des convulsions sont rapportées dans $\frac{3}{4}$ des cas. Le CCTV (2008) affirme qu'en dehors de la relative surexposition de l'enfant (rapport « surface corporelle / poids » défavorable), aucune explication n'est apportée. Ainsi, le CCTV évoque la possibilité d'une simple coïncidence chez l'enfant en mettant en parallèle le petit nombre de cas de convulsions rapportées après application de DEET compte tenu de la prévalence de l'exposition au DEET (aux Etats-Unis, 23% des enfants sont exposés au moins une fois dans l'année) et de la prévalence des convulsions toutes causes confondues (3-5% chez l'enfant).

Par ailleurs, dans une récente étude américaine (Osimitz *et al.*, 2010), on note que plus de 75 millions de citoyens américains utilisent le DEET annuellement avec une fréquence d'utilisation rapportée en moyenne à 10 fois pour l'adulte et 6 fois pour l'enfant. Osimitz *et al.* (2010), soulignent dans cette étude que relativement peu de rapports montrant une induction de signes neurologiques par le DEET ont été publiés.

5.2.3 Mécanismes d'action

Aucune caractérisation du mécanisme d'action du DEET n'est disponible à ce jour, les données mécanistiques sur cette substance restant très limitées. Le mécanisme d'action du DEET n'étant pas caractérisé, seules des hypothèses de mécanismes de répulsion chez les insectes sont proposées dans la littérature scientifique (Pennetier, 2008). Ainsi, Davis (1985), identifie cinq modes d'action potentiels :

1. Inhibition d'un signal attractif ;
2. Inversion de la perception du signal attractif en un message irritant ;
3. Activation d'un récepteur qui pourrait « brouiller » ou entraîner une réponse comportementale inappropriée ;
4. Activation d'un récepteur « à odeur » (un récepteur olfactif des antennes et palpes maxillaires) ;
5. Activation de différents récepteurs causant simultanément la perte du signal spécifique lié à la localisation de l'hôte.

Plus récemment, Dogan *et al.* (1999) ont proposé l'hypothèse d'un mécanisme d'action du DEET passant par une action sur les récepteurs à l'acide lactique, composé présent dans la sueur de l'homme et attractif pour les moustiques.

L'équipe de Lapied (2006) a également émis l'hypothèse d'un mécanisme *in vitro* impliquant une élévation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette hypothèse nécessite cependant d'être étayée par les résultats d'autres recherches.

La dernière hypothèse relative au mécanisme d'action du DEET suppose l'inhibition *in vitro* des cholinestérases (Corbel *et al.*, 2009). Elle sera particulièrement étudiée dans ce rapport.

5.3 Evaluation du risque pour une utilisation du DEET seul

L'évaluation du risque consécutif à l'utilisation du DEET seul en tant que répulsif cutané a été réalisée dans le cadre du rapport européen (Rapport d'évaluation biocides, 2010). L'AEL de 8,2 mg/kg pc/j a été dérivée à partir de la NOAEL (≥ 1000 mg/kg/j) issue de l'étude 90 jours chez le rat par voie cutanée, divisée par un facteur de sécurité de 100. Le résultat a été ajusté pour tenir compte de l'absorption cutanée de la substance chez le rat qui est de 82 % (*versus* 20 % chez l'homme). Considérant une fréquence de deux applications par jour, l'exposition a été évaluée pour les femmes et hommes adultes respectivement à 47 et 60 % de l'AEL répétée, avec pour référence un produit à 15% DEET, en considérant une absorption cutanée de 20%. Par conséquent le risque pour une utilisation du DEET seul en tant que répulsif cutané a été considéré comme acceptable pour les adultes.

Il est à noter que l'évaluation du risque ci-dessus concerne la population générale. L'évaluation de l'exposition chez les professionnels n'a pas été considérée dans le dossier européen (Rapport d'évaluation biocides, 2010).

6 Etudes de co-exposition du DEET avec d'autres substances insecticides/pesticides

6.1 Analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)

6.1.1 Introduction

L'article de Corbel *et al.* 2009 est structuré en quatre parties :

1. Effet insecticide du DEET à l'échelle des individus,
2. Effets neurophysiologiques du DEET sur des préparations neuronales d'insectes et de mammifères,
3. Caractérisation de l'inhibition des cholinestérases (ChE) par le DEET (acétylcholinestérases de drosophile (DmAChE) et humaine (HuAChE), et butyrylcholinestérase (HuBuChE) humaine),
4. Interactions entre le DEET et les anticholinestérasiques.

Dans cette étude, différents modèles biologiques sont utilisés : les moustiques *Aedes aegypti* et *Culex pipiens quinquefasciatus*, des préparations neuronales de blatte, des préparations musculaires de souris ainsi que des cholinestérases purifiées humaines et de drosophile. Les auteurs ont donc travaillé à l'échelle de l'individu, du tissu ou de l'organe, et de la molécule pour établir le pouvoir inhibiteur du DEET sur les cholinestérases. Il à noter que toutes les expérimentations ne montrent pas directement le pouvoir inhibiteur du DEET sur les cholinestérases mais permettent de mieux cibler l'action neurale du DEET en considérant un effet possible sur les cholinestérases.

6.1.2 Effet insecticide du DEET à l'échelle des individus

6.1.2.1 Toxicité tarsale du DEET

La toxicité tarsale du DEET a été testée sur des moustiques femelles *Aedes aegypti*. La méthode utilisée est celle décrite dans la directive de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, WHO 2006, *Guidelines for testing mosquito adulticides intended for indoor residual spraying (IRS) and insecticides-treated nets (ITNs)*). La toxicité tarsale correspond à la toxicité induite par un contact des tarse¹ avec le support traité pendant un temps déterminé. Les doses employées (400-1200 µg/cm²) sont équivalentes à une gamme faible de doses et correspondent à des concentrations en DEET dans la formulation de 5 à 15%. Il est à noter que la gamme des doses appliquées pour la protection personnelle est 400-8000 µg/cm². Les résultats montrent un effet létal dose-dépendant, avec une mortalité de 100% des moustiques à la plus forte dose, 1200 µg/cm². Deux doses létales ont été déterminées : DL₅₀ = 830 ± 30 µg/cm² et une DL₉₅ = 1180 ± 50 µg/cm².

¹ Les tarse sont les appendices situés à l'extrémité du tibia et comportant généralement plusieurs segments. Ils correspondent aux parties inférieures de la patte avec lesquelles l'insecte et en contact avec un support.

6.1.2.2 Toxicité de contact du DEET

La toxicité de contact du DEET a été évaluée par dépôt topique de 0,1 µL de solution de DEET dans l'acétone sur la partie supérieure du pronotum de moustiques femelles. Cinq à huit doses de DEET et de propoxure ont été utilisées chez des moustiques appartenant à l'espèce *Culex pipiens quinquefasciatus*. Les résultats concernant la mortalité des moustiques suite au traitement sont présentés ci-dessous :

DEET

- $DL_{50} = 393,3 \pm 25,4$ ng sa/mg moustique
- $DL_{90} = 1103,0 \pm 25,4$ ng sa/mg moustique

Propoxure

- $DL_{50} = 2,6 \pm 0,2$ ng sa/mg moustique
- $DL_{90} = 10,5 \pm 1,6$ ng sa/mg moustique

Aucune relation dose-mortalité n'a été présentée et la toxicité du DEET n'a pas été située sur une échelle comparative comprenant d'autres substances insecticides toxiques pour le moustique. Cependant, sur la base de la toxicité aiguë, les résultats montrent que le DEET possède un effet insecticide **100 à 150 fois plus faible** que celui du propoxure.

6.1.3 Effets neurophysiologiques du DEET sur des préparations neuronales d'insectes et de mammifères

6.1.3.1 Etude sur la blatte

Les études sur la blatte ont porté sur les inter-neurons afférents cercaux géants du ganglion abdominal. Les concentrations en DEET utilisées ici sont de 0,5 et 1 µM. Les résultats montrent que le DEET, à la concentration de 1 µM, induit une réponse biphasique sur les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE). Durant les 3 premières minutes, le DEET induit une augmentation de l'amplitude des PPSE qui peut être attribuée à une augmentation de l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique consécutive à l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7). Après 3 minutes, le DEET induit une dépression de l'amplitude des PPSE ce qui suggère fortement une régulation de la libération de l'ACh par des récepteurs cholinergiques muscariniques présynaptiques. Afin de bloquer l'action des récepteurs présynaptiques, les auteurs ont effectué les mêmes enregistrements en présence d'atropine. Dans ce cas, seule une augmentation de l'amplitude des PPSE est observée.

Les auteurs soulignent qu'une réponse biphasique est observée avec les inhibiteurs des cholinestérases telles que les carbamates. Les auteurs suggèrent donc que le DEET puisse avoir un effet inhibiteur sur l'AChE. Il est à noter que d'autres inhibiteurs de l'AChE peuvent aussi induire une réponse biphasique. Ainsi, les résultats de l'étude de Corbel *et al.* (2009) sont en accord d'une part avec ceux obtenus avec d'autres anticholinestérasiques et, d'autre part avec l'action de DEET en présence d'atropine. De plus, le DEET augmente l'amplitude des PPSE composés et l'amplitude et la fréquence des PPSE unitaires. Les auteurs concluent que l'ensemble de ces résultats indique clairement qu'en présence de DEET, l'ACh n'est pas efficacement hydrolysée par l'AChE dans la fente synaptique, conclusion en accord avec les résultats obtenus.

6.1.3.2 Etude chez la souris

Comme l'AChE est une enzyme ubiquiste, un modèle expérimental vertébré murin a été utilisé pour confirmer l'action du DEET sur la transmission cholinergique observée chez la blatte. Cette étude a été réalisée sur le muscle phrénique hémi diaphragme en enregistrant les courants induits au niveau de la plaque motrice (jonction neuromusculaire). Le DEET a été utilisé à la

concentration de 500 μM en présence de μ -conotoxine GIIIB, un inhibiteur des canaux sodium des fibres musculaires, pour s'affranchir de la contraction musculaire sans bloquer les canaux sodium du nerf moteur. Les résultats montrent que le DEET n'induit qu'un effet très mineur sur l'amplitude des potentiels de plaques (endplate potentials, EPPs) mais qu'il augmente la phase de décroissance. La constante de décroissance (K_D) est augmentée d'environ un facteur 3 en présence de DEET ($K_D = 11,1 \pm 0,7$ ms) par rapport à celle du contrôle ($K_D = 3,8 \pm 0,08$ ms). Les auteurs concluent que cet effet est caractéristique d'une inhibition de l'acétylcholinestérase et d'une persistance de l'acétylcholine dans la fente synaptique de la plaque motrice.

Toutefois, il est possible de s'interroger sur la spécificité de l'action du DEET chez la souris. L'effet du DEET sur la phase de décroissance est observé à une concentration très élevée en DEET (500 μM), bien supérieure à celles avec lesquelles des effets sur la transmission cholinergique sont observés chez la blatte (0,5 et 1 μM).

6.1.4 Caractérisation de l'inhibition des cholinestérases par le DEET

6.1.4.1 Inhibition des cholinestérases par le DEET

Afin de vérifier une action inhibitrice du DEET sur les cholinestérases, suggérée par les études d'électrophysiologie, il a été analysé les effets *in vitro* du DEET sur des cholinestérases purifiées, l'acétylcholinestérase de *Drosophila melanogaster* (DmAChE), l'acétylcholinestérase humaine (HuAChE) et la butyrylcholinestérase humaine (HuBuChE). Le moustique étant une des cibles du DEET, il aurait été intéressant d'inclure dans cette étude l'AChE de moustique. Cela aurait permis de mieux préciser le mode d'action du DEET qui n'est pas encore clairement établi à ce jour. Dans cette étude, les temps de pré-incubation du DEET avec les cholinestérases n'ont pas été indiqués. Cela aurait été très utile lorsque l'on considère que le DEET peut présenter une action covalente, similaire à celle des carbamates, comme cela est pressenti dans l'article, et que l'action des carbamates sur les cholinestérases est dépendante du temps. Trois concentrations de DEET ont été utilisées : 1, 3 et 10 mM. En se basant sur les activités aux concentrations en substrat présentant l'activité maximum, le pouvoir inhibiteur du DEET (seul étudié dans l'article de Corbel *et al.*, 2009) peut être comparé à celui d'autres inhibiteurs tels que l'ésérine (un inhibiteur général des cholinestérases), le BW284C51 (un inhibiteur spécifique des acétylcholinestérases), l'éthiopropazine et l'iso-OMPA (deux inhibiteurs des butyrylcholinestérases) (Figure 6).

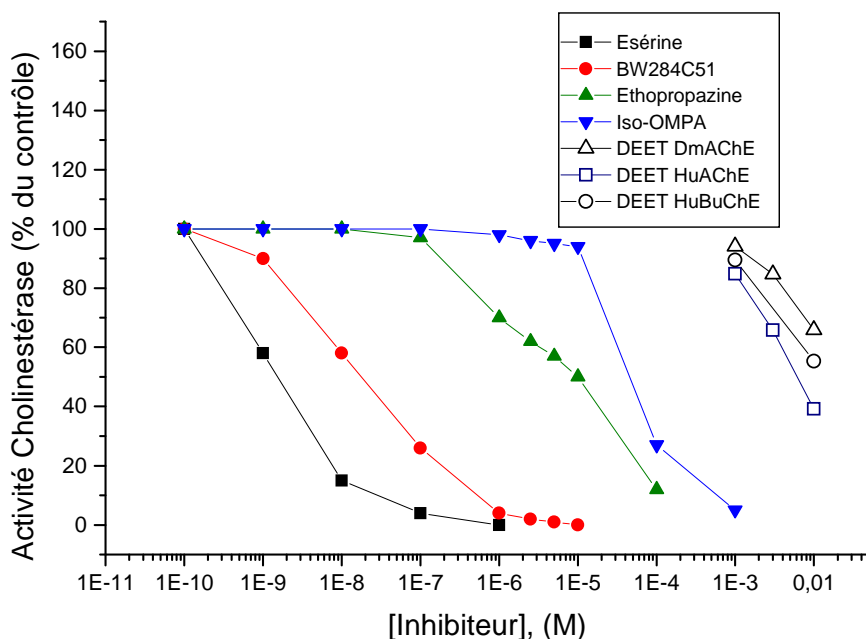


Figure 6 : Effet du DEET sur les cholinestérases

Les effets du DEET sur la butyrylcholinestérase humaine (HuBuChE) et sur les acétylcholinestérases de *Drosophila melanogaster* (DmAChE) et humaine (HuAChE) sont comparés, à titre d'exemple, à ceux d'autres inhibiteurs des cholinestérases sur l'acétylcholinestérase d'abeille (ésérine, BW284C51, éthopropazine et iso-OMPA. Les résultats obtenus avec l'ésérine, le BW284C51, l'éthopropazine et l'iso-OMPA ne figurent pas dans l'article de Corbel et al. (2009). Ils ont été regroupés avec ceux obtenus avec le DEET afin de mieux visualiser le pouvoir inhibiteur de ce dernier.

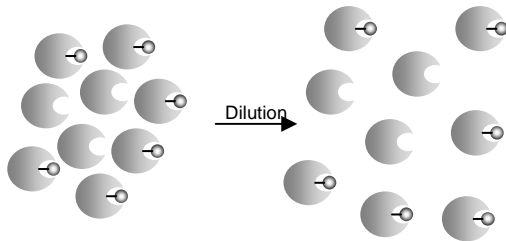
Il apparaît que la sensibilité du DEET pour les cholinestérases est, par ordre décroissant, HuAChE > HuBuChE > DmAChE. Le DEET n'atteint même pas le pouvoir inhibiteur de deux inhibiteurs spécifiques des BuChE, mais non spécifiques de l'AChE, tels que l'éthopropazine et l'iso-OMPA qui agissent pourtant à de très fortes concentrations. Ainsi, les effets inhibiteurs du DEET sur les cholinestérases ne se manifestent que pour des concentrations supérieures au millimolaire. De plus, la concentration maximum, à partir de laquelle se manifeste l'inhibition par excès de substrat augmente avec la concentration en DEET, ce qui suggère une action sur le site périphérique.

Les auteurs précisent que la pré-incubation des ChE avec le DEET ne modifie pas l'inhibition et que la dilution de l'enzyme restaure l'activité. Cette information appelle plusieurs remarques. Le fait que la pré-incubation ne modifie pas l'inhibition par le DEET n'est pas compatible avec une action covalente du DEET, selon une cinétique du premier ordre. Ce résultat est en accord avec le fait que la dilution de l'enzyme restaure l'activité. En effet, dans le cas d'une inhibition covalente, comme c'est le cas avec les carbamates et les organophosphorés, la dilution de l'enzyme n'aurait eu aucun effet sur l'activité enzymatique car la fraction d'enzyme inhibée n'aurait pas été modifiée. En revanche, dans le cas d'une inhibition non covalente, la dilution de l'enzyme a pour effet de réduire la concentration en inhibiteur et de déplacer l'équilibre vers la dissociation du complexe enzyme-inhibiteur, ce qui a pour effet de faire chuter la fraction d'enzyme inhibée donc d'augmenter l'activité (Figure 7). Pour qu'une inhibition covalente soit compatible avec le fait que la pré-incubation ne modifie pas l'inhibition et que la dilution restaure l'activité, il faudrait que la réactivation de la ChE, après réaction DEET sur l'hydroxyle de la sérine du site actif, soit fulgurante et que le résidu de DEET généré agisse comme un inhibiteur non covalent sur la ChE.

Ainsi, il est possible de conclure que :

- Le DEET agit apparemment comme un inhibiteur réversible (non covalent) des ChE.
- Le DEET est un inhibiteur faible des ChE.

A : Cas d'une inhibition covalente



B : Cas d'une inhibition non covalente

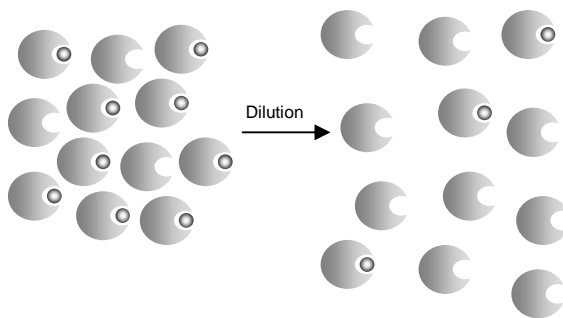


Figure 7 : Effet de la dilution d'une enzyme inhibée sur l'activité enzymatique.

A, Cas d'une inhibition covalente de l'AChE par un inhibiteur. La dilution de l'enzyme inhibée n'a aucun effet sur la récupération de l'activité enzymatique car la proportion de forme inhibée ici, $5/9^{\text{èmes}}$ ne change pas du fait que l'inhibiteur est lié de façon covalente à l'enzyme. B, Cas d'une inhibition non covalente. Lorsque l'enzyme inhibée est diluée, la concentration en inhibiteur diminue ce qui a pour effet de déplacer l'équilibre $\text{Enzyme} + \text{Inhibiteur} \rightleftharpoons \text{Enzyme-Inhibiteur}$ vers la gauche (vers les formes libres) et donc de faire baisser la proportion de sites actifs occupés par l'inhibiteur. Dans cet exemple, la proportion d'enzyme inhibée passe de 75% à 25% quand l'enzyme est diluée.

6.1.4.2 Effet du DEET sur l'inhibition de l'AChE par le propoxure

Après avoir montré que le DEET pouvait interagir avec le site actif des ChE, il a été étudié les interactions possibles entre le DEET et les insecticides carbamates. Pour cela, la constante bimoléculaire de carbamylation (K_i , $(\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$) de l'AChE par le propoxure a été déterminée à des concentrations en DEET variant de 0,01 à 10 mM. Deux cholinestérases ont été étudiées : la HuAChE et la DmAChE. Les résultats montrent une diminution de la constante bimoléculaire de carbamylation lorsque la concentration en DEET augmente. Ces résultats montrent un effet protecteur du DEET, vis-à-vis de l'action du propoxure au niveau du site actif de l'enzyme, et suggèrent une interaction du DEET avec le site actif des cholinestérases.

6.1.4.3 Fixation du DEET sur les sites périphérique et catalytique des ChE

Les constantes de fixation du DEET sur les sites périphériques et catalytiques de l'AChE et de la BuChE ont été déterminées au moyen de cinétiques simultanées d'inhibition de l'hydrolyse du substrat et de carbamylation.

Site périphérique

- $K_d = 1,02 \pm 0,03$ mM : DmAChE
- $K_d = 8,39 \pm 6,97$ mM : HuAChE
- $K_d = 0,37 \pm 0,05$ mM : HuBuChE

Site catalytique

- $K_d = 4,67$ mM : HuAChE
- $K_d = 1,08$ mM : HuBuChE
- DmAChE, le DEET ne pénètre pas dans la gorge du site catalytique (2X plus étroite que celle de HuAChE)

A titre d'exemple, trois inhibiteurs des acétylcholinestérases utilisés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, le donepezil, la tacrine et la fasciculine, issue de venin de serpent, possèdent des K_d de 40 μ M, 0,015-1 μ M et 1-10 pM, respectivement. Ainsi, la fixation du DEET sur les sites périphérique et catalytique des cholinestérases peut être considérée comme étant de faible affinité.

6.1.4.4 Docking du DEET sur le site catalytique des acétylcholinestérases humaines

Afin de voir si la fixation du DEET au niveau du site actif de l'acétylcholinestérase est possible, il a été conduit des études *in silico* d'arrimage (docking) de l'intermédiaire tétraédrique dans la gorge du site actif. Les résultats obtenus en utilisant la structure 3D de l'AChE humaine cristallisée montrent que le DEET (sous forme d'intermédiaire tétraédrique, donc dans une réaction d'inhibition covalente avec l'AChE : voir Figure 8) peut se loger dans le site catalytique de l'AChE.

L'utilisation d'un intermédiaire tétraédrique dans les études d'arrimage n'est pas pertinente car cette hypothèse n'est pas en accord avec les résultats précédents qui suggèrent plutôt une action non covalente du DEET. Ainsi, si l'inhibition de l'AChE par le DEET n'est pas covalente, les études d'arrimage de l'intermédiaire tétraédrique n'ont pas lieu d'être. En revanche, une inhibition covalente ne serait compatible qu'avec une réactivation très rapide de l'enzyme.

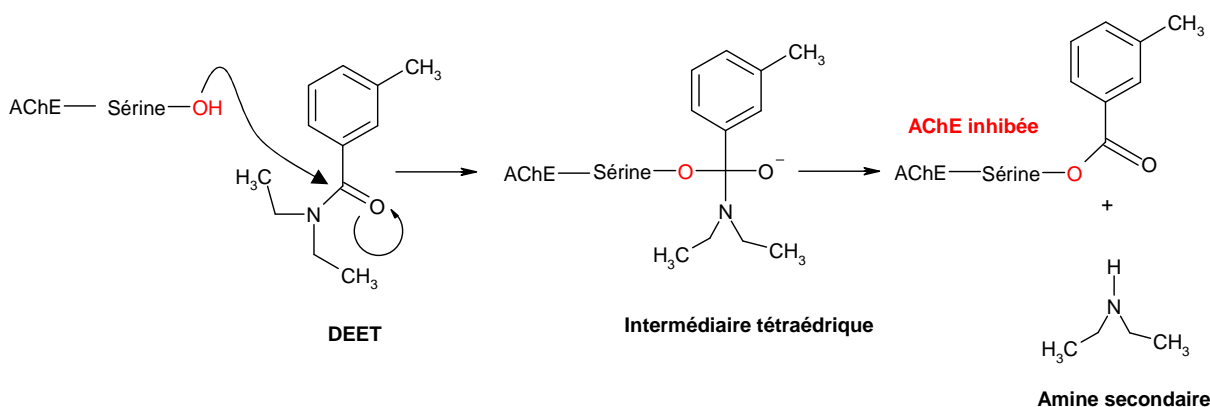


Figure 8 : Mécanisme de la formation d'un intermédiaire tétraédrique.

La formation d'un intermédiaire tétraédrique nécessite une réaction covalente entre l'hydroxyle de la sérine du site actif de l'acétylcholinestérase et la molécule de DEET. L'attaque nucléophile de l'oxygène se fait au niveau du site électrophile du DEET, au niveau du carbonyle. Il s'ensuit la formation d'un intermédiaire tétraédrique, c'est-à-dire un adduit temporaire. Dans une dernière étape, il y a départ de l'amine secondaire, qui constitue ici le groupement libérable, avec formation d'un adduit au niveau de la sérine du site actif qui aboutit à l'inhibition de l'enzyme.

6.1.5 Interaction entre le DEET et les substances anticholinestérasiques

6.1.5.1 Toxicité conjointe du DEET et du propoxure

Ayant établi que le DEET se fixe sur le site actif de l'AChE et qu'il impose une gêne stérique à l'entrée du substrat dans la gorge du site catalytique de l'AChE, les auteurs ont étudié les interactions potentielles entre le DEET et les insecticides carbamates. Les résultats montrent une synergie entre le DEET et le propoxure chez le moustique *Culex pipiens quinquefasciatus*. Cependant, les DEET et le propoxure étant tous deux toxiques, et il est impossible de savoir quelle molécule synergise l'autre. Il est seulement possible de parler d'une interaction synergique entre le DEET et le propoxure. Dans ces études, il est utile de noter que l'observation d'une interaction synergique entre le DEET et le propoxure repose sur une meilleure adaptation des données de toxicité au modèle décrivant une interaction synergique. Différents modèles ont été testés.

6.1.5.2 Approche électrophysiologique chez la blatte

Après avoir montré une interaction synergique entre le DEET et le propoxure, des expérimentations électrophysiologiques ont été conduites pour étudier les interactions entre le DEET (D) et le propoxure (P) au niveau neural. Cette étude a été réalisée chez la blatte *Periplaneta americana* avec deux doses de DEET D_1 et D_2 (non précisées dans l'article mais qui correspondent à 0,5 et 1 μM : information de l'auteur) et a pour objectif de mesurer les effets du DEET et du propoxure, seuls ou associés, sur les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) générés au niveau des synapses cholinergiques. Bien que le DEET et le propoxure seuls augmentent l'amplitude des PPSE, aucune interaction (potentialisation, synergie additive ou renforçatrice) entre le DEET et le propoxure n'a été mise en évidence (Effets $P+D_1 \approx D_1$ et effets $P+D_2 \approx D_2$).

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux observés dans l'étude précédente, chez le moustique, *Culex pipiens quinquefasciatus*, qui montraient une action synergique de l'association DEET-propoxure. Toutefois, le modèle de système cholinergique utilisé dans l'étude pourrait être trop réducteur pour démontrer un effet synergique par rapport aux différentes cibles potentielles de ces deux substances actives. Cette dernière observation est justifiée dans le sens où le propoxure n'agit pas seulement sur les cholinestérasés mais également sur les hydrolases à sérine dont les estérasés et les amidases. Ainsi, il se peut que l'effet synergique entre le propoxure et le DEET soit induit par des cibles différentes du système cholinergique.

6.1.5.3 Approche électrophysiologique chez la souris

Afin de poursuivre la caractérisation des interactions entre les carbamates et le DEET au niveau neural, une étude complémentaire a été conduite chez la souris. Le modèle expérimental est la jonction neuromusculaire du muscle phrénique hémi diaphragme. Le paramètre étudié est la demi-vie de décroissance du potentiel de plaque. La substance carbamate utilisée n'est pas le propoxure, comme avec le modèle blatte, mais la néostigmine. Le DEET est utilisé à une concentration très élevée, 500 μM .

Les résultats montrent que le DEET augmente la demi-vie de décroissance des potentiels de plaque et que l'effet du DEET + néostigmine est environ 2 fois supérieur à celui du DEET seul. Cependant, dans cette étude, il manque le contrôle néostigmine seule qui aurait permis de voir quelle était la nature réelle de l'interaction entre le DEET et la néostigmine. Des résultats identiques sont observés en utilisant une approche mettant en œuvre des stimuli simples et doubles. Toutefois, dans la publication, la légende de la figure 4e de l'étude ne permet pas de voir précisément où sont les contrôles, les traitements au DEET seul, à la néostigmine seule ou à l'association DEET + néostigmine.

De cette étude, les auteurs concluent que : (i) le DEET a une action inhibitrice sur l'AChE des plaques motrices de l'hémi diaphragme de souris. Il est utile de préciser qu'il s'agit ici d'une observation indirecte, d'après les résultats *in vitro*. (ii) Le DEET empêche l'action ultérieure de la

néostigmine. L'étude avec la néostigmine ne permet pas cette conclusion, d'autant plus qu'il manque un contrôle néostigmine seule. (iii) A molarité égale, le DEET est moins actif que la néostigmine sur la jonction neuro-musculaire de l'hémi diaphragme. Il n'est pas possible de tirer cette conclusion (à moins d'avoir réalisé d'autres études n'apparaissant pas dans cet article) car les concentrations testées en DEET (500 µM) et néostigmine (3 µM) sont très différentes.

6.1.6 Conclusions de l'analyse critique de l'étude de Corbel *et al.* (2009)

Quatre principales conclusions peuvent être tirées de cet article :

- Le DEET inhibe *in vitro* les AChE de drosophile et humaine, et la BuChE humaines.
- On observe un faible effet du DEET *ex vivo* chez la souris mais à une concentration élevée (500 µM).
- Le DEET est un inhibiteur faible des ChE.
- L'affinité du DEET pour les ChE est faible ($K_d \approx 0,3-10$ mM) comparée à celle d'autres inhibiteurs comme la tacrine, le donepezil, la fasciculine ou le BW284C51.

Ainsi, cette étude permet de mieux caractériser le mécanisme d'action de la substance DEET seule, mais en raison des nombreuses limites liées aux protocoles utilisés dans les études de co-exposition, **aucune extrapolation au professionnel de la LAV ne peut être réalisée à partir de cette publication**. D'autres études de co-exposition du DEET avec des substances insecticides/pesticides neurotoxiques existent dans la littérature scientifique, et sont présentées dans la partie suivante.

6.2 Autres études de co-exposition avec le DEET

Il existe dans la littérature scientifique plusieurs études explorant les effets synergiques du DEET avec d'autres substances neurotoxiques. Ces études ont été réalisées suite à l'observation chez les vétérans américains de la guerre du Golfe d'un syndrome inexplicable caractérisé par une fatigue chronique, des douleurs musculaires et articulaires, des maux de tête, des pertes de mémoire et de l'irritabilité (Abou-Donia *et al.*, 1996). Certaines équipes de recherches ont proposé un lien entre ce syndrome neurotoxique et l'exposition concomitante à des substances neurotoxiques parmi lesquelles figurent le DEET, le bromure de pyridostigmine, la perméthrine et le chlorpyrifos, d'où la réalisation d'études de co-exposition du DEET avec ces trois substances. Il existe également, dans la littérature scientifique, des études de co-exposition du DEET avec le propoxure, dans le cadre d'une utilisation du mélange DEET + propoxure pour l'imprégnation des moustiquaires afin de pallier les difficultés de la résistance des moustiques aux pyréthrinoïdes habituellement utilisées pour l'imprégnation des moustiquaires. Les effets toxiques observés lors de la co-exposition au DEET et d'autres substances neurotoxiques sont décrits ci-après de manière détaillée, afin d'éventuellement caractériser le mode d'interaction du DEET avec des substances neurotoxiques.

6.2.1 Substances utilisées dans les études de co-exposition avec le DEET

Les mécanismes d'action des différentes substances administrées dans ces études en concomitance avec le DEET seront d'abord décrits, puis les informations disponibles et les hypothèses relatives aux interactions entre le DEET et ces substances seront exposées.

■ Le bromure de pyridostigmine

Le bromure de pyridostigmine (PB) est indiqué dans le traitement de la myasthénie et de l'atonie intestinale. Dans le cadre de la guerre du Golfe, les militaires américains ont absorbé des

doses de PB comprises entre 20 et 30 mg, traitement prophylactique préconisé en raison d'une exposition possible aux organophosphorés.

Mécanisme d'action : Le PB est une substance parasymphomimétique, inhibitrice des cholinestérasés. En raison de la présence d'un groupement ammonium quaternaire, le PB passe difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) et n'exerce donc pas son activité inhibitrice des cholinestérasés au niveau du système nerveux central (SNC) mais seulement au niveau du système nerveux périphérique (SNP). A la différence des inhibiteurs des cholinestérasés irréversibles tels que les organophosphorés, l'activité enzymatique des cholinestérasés, après inhibition par le PB, peut être restaurée. Le PB agit en tant qu'inhibiteur irréversible des cholinestérasés en carbamylant la sérine du site actif (Dawson, 1995). Cependant, alors que le taux de réactivation spontanée des cholinestérasés phosphorylées par les organophosphorés est très faible, les cholinestérasés carbamylés par le PB subissent une réactivation spontanée assez rapide.

■ Le chlorpyrifos

Le chlorpyrifos est une substance appartenant à la famille des organophosphorés, largement utilisée en agriculture. Les militaires américains ont donc été potentiellement exposés à cette substance d'où les études de co-exposition avec le DEET, disponibles dans la littérature scientifique.

Mécanisme d'action : Le chlorpyrifos inhibe les cholinestérasés *via* une phosphorylation du groupement hydroxyle de la sérine du site actif de ces enzymes de manière analogue à l'acétylation physiologique de ces enzymes. Cependant, à la différence de l'acétylation des cholinestérasés, qui lors de la catalyse conduit rapidement à la formation de l'acide acétique et de l'enzyme régénérée, l'enzyme phosphorylée est très stable et n'est donc plus capable de participer à l'hydrolyse de l'acétylcholine. Il est à noter que le chlorpyrifos passe la BHE et a donc la possibilité d'inhiber les cholinestérasés au niveau du SNC.

■ La perméthrine

La perméthrine est une substance insecticide appartenant à la famille des pyréthriinoïdes de type I, qui ne possède pas de groupement cyano sur le carbone alpha de la partie alcool phénoxybenzylique de la molécule à la différence des pyréthriinoïdes de type II. Les tenues des militaires américains étaient imprégnées de perméthrine durant la guerre du Golfe.

Mécanisme d'action : La perméthrine agit sur les canaux sodium voltage-dépendants. Ainsi, cette substance ralentit les propriétés d'activation/inactivation des canaux sodium voltage-dépendants entraînant un état stable d'hyperexcitabilité des cellules.

■ Le propoxure

Le propoxure est une substance appartenant à la famille des carbamates. Les études de co-exposition avec le DEET et le propoxure ont été réalisées afin de vérifier l'efficacité de ce mélange potentiellement utilisable pour l'imprégnation des moustiquaires. En effet, le mélange d'un répulsif et d'une substance non-pyréthriinoïde pourrait constituer une alternative aux pyréthriinoïdes habituellement utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires, et auxquels de nombreuses espèces de moustiques sont résistantes.

Mécanisme d'action : Le propoxure agit en inhibant les cholinestérasés de façon covalente. Le mécanisme d'inhibition du propoxure est sensiblement identique à celui des organophosphorés ; la différence repose sur une réaction de carbamylation du groupement hydroxyle de la sérine du site actif des cholinestérasés et non une phosphorylation.

6.2.2 Etudes de co-exposition

Une première étude réalisée chez des poules, par Abou-donia *et al.* (1996) fait état d'une toxicité exacerbée lors de la co-exposition au DEET, au PB et au chlorpyrifos. Les poules ont été traitées cinq jours par semaine durant 60 jours avec du PB (5 mg/kg pc/j par gavage), du DEET (500 mg/kg pc/j, par voie sous cutanée) et du chlorpyrifos (10 mg/kg pc/j, par voie sous cutanée). Ces substances ont été administrées seules ou en mélange (PB+DEET, PB+chlorpyrifos, DEET+chlorpyrifos, PB+DEET+chlorpyrifos). Les résultats montrent que le DEET produit une légère inhibition des BuChE plasmatiques. Lors de la coexposition au DEET+PB, on observe une forte inhibition des BuChE plasmatiques, supérieure à celle observée avec le PB seul. De même, les résultats montrent une forte inhibition des AChE du système nerveux central avec le mélange chlorpyrifos+DEET, supérieure à celle observée avec le chlorpyrifos seul. Une forte inhibition des BuChE plasmatiques et des AChE du système nerveux central est aussi montrée après exposition au mélange DEET+PB+chlorpyrifos, supérieure à celle observée avec le PB, le DEET et le chlorpyrifos seuls. Les auteurs émettent les hypothèses suivantes :

- a) le DEET augmenterait la pénétration du chlorpyrifos,
- b) le PB, le DEET et le chlorpyrifos sont métabolisés *via* les mono-oxygénases à fonctions mixtes (cytochrome P450, CYP 450), les hydrolases, les estérases ou les amidases qui constituent des enzymes de détoxification, ainsi, pourrait-il y avoir une compétition entre ces enzymes,
- c) une modification de la perméabilité cérébrovasculaire pourrait augmenter le passage de ces substances au niveau du SNC.

Une deuxième étude chez la souris ICR a été réalisée par Chaney *et al.* (1999). Les souris ont été exposées au PB à différentes concentrations (2, 3, 4 et 5 mg/kg pc/j) et au DEET (100, 200, 400, 700 mg/kg pc/j), seuls ou en coexposition, par voie intrapéritonéale en administration unique. Un antagoniste muscarinique central (le sulfate d'atropine), un antagoniste muscarinique périphérique (le nitrate de méthyl atropine), un antagoniste nicotinique (mécamylamine) et des anticonvulsifs (dextrorphan, diazépame, phénobarbital et fosphénytoïne) ont été également injectés aux souris 15 minutes avant le traitement afin d'explorer les différents mécanismes d'une synergie possible entre le DEET et le PB. Les résultats montrent que la coexposition au PB (3 mg/kg pc/j) et au DEET (100 mg/kg pc/j) produit une fréquence de convulsions supérieure à celle observée avec les substances seules. Ni les antagonistes muscariniques périphériques ou centraux, ni les antagonistes nicotiniques n'ont diminué les convulsions produites avec le DEET, ce qui suggère une action non cholinergique. L'interaction PB/DEET passerait probablement par un mécanisme impliquant les récepteurs muscariniques puisque les souris prétraitées au sulfate d'atropine et au nitrate de méthyl atropine ont montré une diminution de la mortalité.

Chaney *et al.* (2000) ont réalisé une nouvelle étude *in vivo* sur des rats Sprague-Dawley et une étude *in vitro* sur des cerveaux de rats. Dans l'étude *in vivo*, le DEET (200 mg/kg pc/j) et le PB (1, 2 et 3 mg/kg pc/j), seuls ou en mélange, sont administrés par voie intrapéritonéale. Dans l'étude *in vitro*, les homogénats de cerveau de rats ont été traités avec 100 mM de PB et 1 mM de DEET. Au niveau de l'étude *in vivo*, les effets neurotoxiques observés avec le mélange DEET+PB sont supérieurs à ceux observés avec le DEET et le PB seuls. L'inhibition des ChE au niveau du diaphragme, du cœur et du sang total est comparable à celle observée avec le PB seul. Le mélange PB+DEET montre une inhibition des ChE du SNC alors que le PB seul n'en montre pas. Dans l'étude *in vitro*, le PB seul inhibe les ChE du SNC mais pas le DEET et le mélange DEET+PB n'influe pas sur l'inhibition du PB seul. Les hypothèses de mécanisme émises par les auteurs sont les suivantes :

- a) le DEET faciliterait l'accès du PB au SNC,
- b) les fortes doses de PB et de DEET entraîneraient de fortes convulsions qui pourraient endommager la BHE.

Abou-Donia *et al.* ont réalisé en 2003 une étude chez des rats Sprague-Dawley, traités par voie cutanée avec du DEET (4, 40, 400 mg/kg pc/j), de la perméthrine (0,013 ; 1,3 et 13 mg/kg pc/j) pendant 60 jours et, durant les 15 derniers jours du traitement, du PB (0, 13 ; 1,3 et 13 mg/kg pc/j) administré par gavage. Les résultats restent cependant contradictoires avec ceux rapportés précédemment (Rapport biocide, 2010).

Une étude de co-exposition au DEET et au propoxure a été réalisée sur le moustique *Aedes aegypti* (Bonnet *et al.*, 2009). Huit doses ont été testées de 0 à 100%. Un inhibiteur des CYP-450 (oxydases) et un inhibiteur des estérases ont été également administrés aux moustiques une heure avant le traitement. En présence de l'inhibiteur des CYP-450, la toxicité du mélange propoxure+DEET est exacerbée.

Les doses et voies d'administration des différentes substances, utilisées dans ces études, ne sont pas extrapolables à l'homme dans le cadre d'une évaluation du risque lié à la co-exposition à ces substances. En effet, l'étude d'Abou-Donia *et al.* (1996) montre qu'une injection sous cutanée de DEET chez la poule induit le passage systémique direct du DEET. Cependant lorsque ce dernier est appliqué chez l'homme par voie cutanée, l'absorption correspond à 20% lorsqu'il est dilué et à 12% à l'état pur. Ainsi, une dose de 500 mg/kg pc/j chez la poule équivaut à 4,167 mg/kg pc/j chez l'homme soit une application de 292 g de DEET chez un homme de 70 kg, ce qui représente une dose largement supérieure à celle recommandée (U.S. EPA RED, 1998). Les études présentées ici, correspondent donc à des études mécanistiques d'interaction possible et non à des études de toxicité extrapolables à l'homme.

6.3 Conclusions concernant les études de co-exposition

Trois possibilités de mécanismes d'interaction sont mises en évidence par ces études :

1. L'administration concomitante de substances neurotoxiques peut induire une rupture au niveau de la structure cérébrovasculaire de la BHE, permettant le passage de substances n'agissant habituellement pas seules au niveau du SNC ;
2. Un stress provenant de facteurs extérieurs serait susceptible de provoquer un endommagement de la BHE ;
3. Enfin, la dernière hypothèse reposerait sur l'inhibition des cholinestérases.

Le mécanisme d'action du DEET n'est pas encore clairement élucidé. Il est difficile à l'heure actuelle de mettre en évidence un mécanisme d'interaction entre ce dernier et d'autres substances neurotoxiques.

7 Eléments de discussion, conclusions et recommandations

7.1 Discussion et conclusions

L'étude de Corbel *et al.* (2009) rapporte une faible inhibition des cholinestérases *in vitro* et *ex vivo* (chez la souris) à de fortes concentrations de DEET.

En l'absence de données expérimentales de co-exposition au DEET et à la deltaméthrine, ainsi qu'aux autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV, et en l'absence de connaissance du mécanisme princeps d'action du DEET, il n'a pas été possible de réaliser une évaluation des risques sanitaires liés à la co-exposition des professionnels au DEET et aux insecticides utilisés dans la LAV.

Toutefois, il existe quelques études de co-exposition impliquant le DEET associé à des composés organophosphorés ou à des carbamates, substances différentes de celles utilisées en LAV. Les résultats de ces études montrent que certaines associations, incluant le DEET, induisent une augmentation du potentiel neurotoxique par rapport à l'action des substances seules. Il est à noter que ces études présentent des biais méthodologiques et/ou ont été menées selon des conditions d'exposition différentes de celles auxquelles les professionnels de la LAV sont soumis. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, **il n'est pas possible de conclure quant aux effets induits par une co-exposition au DEET et à la deltaméthrine ainsi qu'à d'autres insecticides utilisés ou potentiellement utilisables en LAV.**

En conclusion, l'étude de Corbel *et al.* (2009) ainsi que les autres données disponibles dans la littérature n'apportent pas d'éléments nouveaux nécessitant de modifier les recommandations en vigueur d'utilisation du DEET.

7.2 Recommandations et perspectives

L'absence d'études de co-exposition n'a pas permis de conclure sur le risque inhérent à la co-exposition dans les conditions d'utilisation du DEET et des insecticides de LAV chez l'homme. **Il est donc recommandé que des études permettant de connaître le mécanisme de l'action du DEET et les effets liés à la co-exposition *in vivo* au DEET et à d'autres substances neurotoxiques utilisées en LAV soient réalisées** afin de mieux documenter les mécanismes d'actions et les interactions de ces substances.

Pour rappel, le Haut conseil de la santé publique recommande que les répulsifs corporels soient appliqués uniquement sur les parties découvertes pour éviter des conditions d'occlusion favorables à une augmentation de l'absorption cutanée. Ainsi, l'application du DEET sous les équipements de protection des professionnels de la LAV (combinaison, masque, gants) utilisés lors des traitements est déconseillée car elle aboutirait à des conditions d'occlusion, et par conséquent favoriserait l'absorption cutanée du DEET. Le respect de ces recommandations d'utilisation du DEET exclut donc toute exposition simultanée du DEET avec des insecticides. De plus, le matériel préconisé pour les professionnels lors des opérations de LAV semble assurer une protection efficace contre les piqûres d'insectes.

Par ailleurs, le DEET permet aux opérateurs de la LAV de se protéger efficacement contre les piqûres de vecteurs de maladies graves (chikungunya, paludisme, dengue) auxquelles ils sont particulièrement exposés dans l'exercice de leur profession. En conséquence, toute décision quant

à l'utilisation du DEET par ces professionnels devra être prise en considérant le rapport bénéfice/risque d'une restriction d'usage.

Enfin, bien que des campagnes de sensibilisation sur les risques d'exposition aux dérives de pulvérisation d'insecticides soient effectives en population générale, il est possible que les populations présentes à proximité des zones traitées, en particulier les enfants, soient exposées de façon indirecte et accidentelle à des substances utilisées pour la LAV alors qu'elles peuvent s'être appliquées des répulsifs cutanés par ailleurs. Il serait pertinent d'étudier, pour ces groupes de population, les risques sanitaires éventuels associés à de telles co-expositions dans les cas particuliers où l'information sur l'utilisation de ces substances ne serait pas parvenue à leur connaissance.

Dans l'attente des résultats d'études permettant de mieux appréhender le risque de co-exposition, Il est proposé de se rapporter aux recommandations de l'Afssaps et aux campagnes de sensibilisation sur la conduite à tenir lors des opérations de LAV.

Le Comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations, objets du présent rapport lors de sa séance du 27 mai 2010 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

8 Bibliographie : publications, rapports, ouvrages et thèses

Abdel-Rahman A.A., Shetty A.K., Abou-Donia M.B. (2001). Subchronic dermal application of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and hippocampus, and purkinje neuron loss in the cerebellum. *Experimental Neurology*, 172: 153-171.

Abou-Donia M.B., Wilmarth K.R., Abdel-Rahman A.A. *et al.* (1996). Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundamental and Applied Toxicology*, 34: 201-222.

Abou-Donia M.B., Goldstein L.B., Dechovskaia A. *et al.* (2001). Effects of daily dermal application of DEET and epermethrin, alone and in combination, on sensorimotor performance, blood-brain barrier, and blood-testis barrier in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 62: 523-541.

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). (2007). La lutte antivectorielle dans le cadre de l'épidémie de chinkungunya sur l'île de la Réunion. Evaluation des risques et de l'efficacité des produits adulticides. Rapport du bureau d'évaluation des risques des produits et agents chimiques, Saisine n°2006/002. Maisons-Alfort. En ligne : http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/340275626509802088641727338337/adulticides_vdef.pdf [dernière consultation le 21/07/2010]

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps). (2010). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé suite à la demande d'avis relatif à une étude sur la toxicité du N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET). Saint-Denis. En ligne : <http://www.afssaps.fr/Infos-de-securite/Information-produit-Information-traitement/Avis-relatif-a-une-etude-sur-la-toxicite-du-DEET> [dernière consultation le 21/07/2010]

Antwi F.B., Shama L.M., Peterson R.K. (2008). Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51: 31-36.

ATSDR (2004a). Guidance Manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures. Atlanta, GA: ATSDR, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

ATSDR (2004b). DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide) Chemical Technical Summary for Public Health and Public Safety Professionals.

En ligne : <http://www.atsdr.cdc.gov/consultations/deet/health-effects.html> [dernière consultation le 22/03/2010]

Bliss C.I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, 26: 585-615.

Bonnet J., Pannetier C., Duchon S. *et al.* (2009). Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasites and vectors*, 2: 17.

Carpenter C.P., Weil C.S., Smyth H.F. Jr. (1974). Range-finding toxicity data: list 8. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 28: 313-319.

Chaney L., Rockhold R.W., Wineman R.W. *et al.* (1999). Anticonvulsant-resistant seizures following pyridostigmine bromide (PB) and N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Toxicological Sciences*, 49: 306-311.

- Chaney L., Wineman R.W., Rockhold R.W. *et al.* (2000). Acute effects of an insect repellent, *N,N*-diethyl-*m*-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 165: 107-114.
- Comité de coordination de toxicovigilance (CCTV). (novembre 2007). Exposition à des répulsifs antimoustiques : cas enregistrés dans la BNCI. Rapport final du Groupe Travail « Médicaments ». En ligne : http://www.centres-antipoison.net/CCTV/rapport_CCTV_repulsifs_2007.pdf [dernière consultation le 20/07/2010]
- Comité de coordination de toxicovigilance (CCTV). (2008). Expositions par répulsifs antimoustiques enregistrées par les Centres antipoison et de toxicovigilance, France, 2000-2006. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. Numéro thématique – santé des voyageurs et des expatriés - n°23-24 du 10 juin 2008. En ligne : http://www.invs.sante.fr/BEh/2008/23_24/beh_23_24_2008.pdf [dernière consultation le 20/07/2010]
- Corbel V., Stankiewicz M., Pennetier C. *et al.* (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biology*, 7: 47.
- Crofton K.M., Kehn L.S., Gilbert M.E. (1995). Vehicle and route dependent effects of a pyrethroid insecticide, deltamethrin, on motor function in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 17: 489-495.
- Davis E.E. (1985). Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 22: 237-43.
- Dogan E.B., Ayres J.W., Rossignol P.A. (1999). Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 97-100.
- European Food Safety Agency (EFSA). (2006). The EFSA's 7th Scientific Colloquium Report - Cumulative Risk Assessment of pesticides to human health: The Way forward (Report). En ligne : http://www.efsa.europa.eu/en/colloquiapesticides/publication/comm_colloque_7_en.pdf [dernière consultation le 19/07/2010]
- Elliot M., Farnham A.W., Janes N.F. *et al.* (1974). Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature* 248: 710-711.
- Finney D.J. (1971). *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press, 232-238, 246-247, 252-254, 262.
- Hertzberg R.C., Rice G., Teuschler L.K. (1999). Methods for health risk assessment of combustion mixtures. In: Roberts S., Teaf C., Bean J., eds. *Hazardous waste incineration: Evaluating the human health and environmental risks*. Boca Raton: CRC Press LLC, 105-148.
- Institut de Veille Sanitaire (InVS) (2009). Dispositif de surveillance et d'alerte sur les effets sanitaires des produits phytopharmaceutiques, antiparasitaires et des répulsifs corporels à la Réunion. Bilan d'une année de fonctionnement – Janvier à décembre 2008. En ligne : http://www.invs.sante.fr/publications/2009/produits_phytopharmaceutiques/plaquette_produits_phytopharmaceutiques.pdf [dernière consultation le 21/07/2010]
- International Programme on Chemical safety (IPCS). (1990). Deltamethrin. *Environmental Health Criteria*; 97, En ligne : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm> [dernière consultation le 20/07/2010]
- Katz T.M., Miller J.H., Hebert A.A. (2008). Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58:865-871.
- Lapied B., Pennetier C., Stankiewicz M. *et al.* (2006). The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through alterations of both neuronal function and synaptic transmission. July 8-12; Vienna, Austria. (Résumé du poster)

- Lautraite S., Sargent D. (2009). Pyrethroids toxicology-A review of attributes and current issues. Bayer CropScience Journal, 62: 195-209.
- Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G.F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. Journal of Physiology, 508: 647-657.
- McCain W.C., Lee R., Johnson M.S. *et al.* (1997). Acute oral toxicity study of pyridostigmine bromide, permethrin, and DEET in the laboratory rat. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 50: 113-124.
- Mount M.E., Moller G., Cook J. *et al.* (1991). Clinical illness associated with a commercial tick and flea product in dogs and cats. Veterinary and Human Toxicology, 33: 19-27.
- Mumtaz M.M., Durkin P.R. (1992). A weight-of-evidence approach for assessing interactions in chemical mixtures. Toxicology and Industrial Health, 8: 377-406.
- Ottoboni M.A. (1984). The dose makes the poison: a plain language guide to toxicology. Berkeley CA: Vincente Books.
- Osimitz T.G., Murphy J.V., Fell L.A. *et al.* (2010). Adverse events associated with the use of insect repellents containing *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET). Regulatory Toxicology and Pharmacology, 56: 93-99.
- Pennetier C. (2008). Interactions entre insecticides non-pyréthroïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae*: Mécanismes, efficacité et impact sur l'évolution de la résistance. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier I. Discipline : Biologie des Organismes. Formation doctorale : Parasitologie.
- Pharmacorama (2006). Acétylcholine, acétylcholinomimétiques. En ligne : <http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Acetylcholine.php> [dernière consultation le 22/03/2010]
- Rapport d'évaluation biocide dans le cadre de la directive 98/8/CE: *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET : CAS 134-62-3). Active substance in Biocidal Products, Product Type 19 (Insect repellent). DOCUMENT I. Rapporteur Member State: Sweden. Draft, November 2007. En ligne : http://circa.europa.eu/Public/irc/env/bio_reports/library?!=/review_programme/ca_reports/pt_19_repellents/november_2008pdf/EN_1.0_&a=d. [dernière consultation le 21/07/2010]
- Rapport d'évaluation biocide dans le cadre de la directive 98/8/CE: Deltaméthrin (Deltaméthrin : CAS 52918-63-5). Active substance in Biocidal Products, Product Type 18 (Insecticide). DOCUMENT I. Rapporteur Member State: Sweden. Draft, June 2008. En ligne : http://circa.europa.eu/Public/irc/env/bio_reports/library?!=/review_programme/ca_reports/pt18_insecticides/deltamethrin_sanitizedpd/EN_1.0_&a=d [dernière consultation le 21/07/2010]
- Ray D.E., Fry J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. Pharmacology and Therapeutics, 111: 174-193.
- Roberts T.R., Hutson D.H. (1999). Metabolic pathways of agrochemicals. Part 2: Insecticides and fungicides. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Song J.H., Narahashi T. (1996). Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by pyrethroid tetramethrin. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 277: 445-453.
- Teuschler L.K., Hertzberg R.C. (1995). Current and future risk assessment guidelines, policy, and methods development for chemical mixtures. Toxicology, 105:137-144.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1986). Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. EPA/630/R-98/002. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1998). Guidelines for neurotoxicity risk assessment. EPA/630/R-95/001F. April, 1998. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Reregistration Eligibility Decision (RED) DEET (1998). EPA738-R-98-010. Prevention, Pesticides And Toxic Substances. Washington, DC: En ligne : <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0002red.pdf> [dernière consultation le 21/07/2010]

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2000). Supplementary Guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. August 1, 2000. EPA/630/R-00/002. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2000). Neurotoxicity of chemical mixtures: aggregate and cumulative exposure. SYMPOSIUM. April 27, 2000. OPP Technical Training Committee, OPP Scientific and Technical Training Committee.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2003). Framework for Cumulative Risk Assessment. EPA/630/P-02/001F. May, 2003. Risk Assessment Forum. Washington, DC.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettres de saisine



Ministère de la Santé et des Sports

Paris, le 12 AOU 2009

Direction générale de la santé
Sous direction Prévention des risques infectieux
Bureau des Risques infectieux et de la politique vaccinale
DGS/RI1 - N°
Personne chargée du dossier : Frédéric JOURDAIN
Téléphone : 01 40 56 65 06
Télécopie : 01.40.56.78 00
mél : frederic.jourdain@sante.gouv.fr

Le Directeur général de la Santé
à
Monsieur le Directeur général de
l'Agence française de sécurité
sanitaire des produits de santé

000209

Objet : demande d'avis relatif à une étude sur la toxicité du DEET

Le N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET) est un produit biocide (TP19) largement utilisé en tant que répulsif cutané.

Une étude sur une éventuelle toxicité de ce produit a été publiée dans la revue *BioMed Central Biology* par une équipe coordonnée par l'Institut de Recherche pour le Développement et l'Université d'Angers¹. Cette étude suggère que le DEET pourrait présenter une action anticholinestérasique.

Aussi, je souhaiterais disposer d'un avis relatif à cette étude, qui précisera notamment si celle-ci est de nature à modifier les recommandations émises en 2009 par le groupe d'experts de l'AFSSAPS. En particulier, un avis concernant la validité des recommandations d'utilisation du DEET, telles qu'exposées au sein du BEH n°23-24 du 2 juin 2009 « Recommandations sanitaires pour les voyageurs 2009 » au regard des conclusions de cette étude m'obligerait, notamment concernant les jeunes enfants. De plus, j'appelle votre attention sur le fait que les professionnels de la lutte antivectorielle sont, d'une part, des utilisateurs réguliers de DEET en tant que protection individuelle et, d'autre part, potentiellement exposés aux produits adulticides et larvicides utilisés dans ce domaine. Par conséquent, je vous remercie de bien vouloir également expertiser ce point.

Étant donné l'importance, d'une part, de la médiatisation de cette étude et, d'autre part, de son utilisation, notamment dans les départements d'Outre-mer, je vous saurais gré de bien vouloir tout mettre en œuvre pour me fournir des éléments avant la fin du mois d'octobre 2009. Mes services restent à votre disposition pour tout complément qui serait nécessaire.

Le Directeur Général de la Santé,

Pr Didier HOUSSIN

Copie : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

¹ Corbel et al. « Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET ». *BMC Biology* 2009, 7:47.



MINISTÈRE DE LA SANTÉ
ET DES SPORTS

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DE
L'ÉNERGIE, DU DÉVELOPPEMENT
DURABLE ET DE LA MER
en charge des Technologies vertes
et des Négociations sur le climat

MINISTÈRE DU TRAVAIL, DES
RELATIONS SOCIALES, DE LA
FAMILLE, DE LA SOLIDARITÉ ET
DE LA VILLE

Direction générale
de la santé

Direction générale de la
prévention des risques

Direction générale
du travail

N° 488

000278

Paris le 16 NOV 2009

Le Directeur général de la santé

Le Directeur général
de la prévention des risques

Le Directeur général du travail

à

Monsieur le Directeur général de
l'Agence Française de Sécurité Sanitaire
de l'Environnement et du Travail
253 Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort

OBJET : demande d'avis relatif à une étude sur la toxicité du N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET).

P. J. : Saisine de l'Afssaps du 12 août 2009.

Copie : Afssaps

En août 2009, l'étude de Corbel *et al.* (BioMed Central Biology, 2009) relative au DEET, répulsif corporel contre les moustiques, a montré que cette substance pourrait être à l'origine d'effets toxiques sur une enzyme clé du système nerveux central des insectes et des mammifères, l'acétylcholinestérase.

Suite à la publication de cette étude, la Direction générale de la santé a saisi l'Afssaps le 12 août 2009 sur la toxicité du DEET, et lui a notamment demandé de se prononcer sur la pertinence des recommandations actuelles d'utilisation du DEET, en particulier en ce qui concerne les jeunes enfants et les professionnels de la lutte anti-vectorielle (LAV), également exposés dans ce cadre à des produits adulticides et larvicides.

L'Afssaps est donc chargée de vérifier, si, à la lumière de cette étude, il est nécessaire de remettre en cause son évaluation relative au DEET et, par conséquent, les recommandations encadrant l'utilisation de ce répulsif corporel.

Pour sa part, l'Afssat réalisera l'analyse critique de cette étude afin d'apprécier sa portée en ce qui concerne des éventuelles co-expositions, principalement des agents de la LAV au DEET et à d'autres substances actives (insecticides en particulier), actuellement utilisés ou potentiellement utilisables, ayant également un effet anticholinestérasique (organophosphorés et carbamates notamment). A cet effet, vous vous appuyerez sur tout organisme compétent et notamment sur les travaux menés par l'Afssaps et l'Afssa dans ce cadre et pourrez également utiliser les données du dossier européen.

Nous vous saurons gré de bien vouloir nous remettre un avis avant fin mars 2010.

Le Directeur Général du Travail

Jean-Denis COMBEXELLE

La directrice générale adjointe
de la santé

Sophie DELAPORTE

le directeur général de la prévention des risques,
délégué aux risques majeurs

Laurent MICHEL

Annexe 3 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom	Date de déclaration des intérêts
Analyse Anses :	Rubrique de la DPI Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	

BADOT	Pierre-Marie	29 novembre 2007 3 novembre 2008 16 février 2009
Analyse Anses :	Aucun lien déclaré /	
Analyse Anses :	Aucun lien déclaré /	

BELZUNCES Luc	19 avril 2008
VB Étude du mode d'action de l'acétamipride financée par Aventis donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (INRA) (10 % du budget du laboratoire) (2001-2003) Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
Analyse Anses :	
CÉZARD Christine	19 décembre 2006
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
DESLAURIERS Michel	26 juin 2007
LD Médecin du travail au sein d'EDF-GDF	
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
EMPEREUR-BISSONNET Pascal	15 avril 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
ENRIQUEZ Brigitte	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
FARDEL Olivier	26 juin 2007
VB Collaboration scientifique avec EDF-SEM (Service des études médicales) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Rennes I) (6 % du budget du laboratoire) (2007-2009)	
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
FÉNET Hélène	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	

FERRARI Luc	11 octobre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
FONTANA Luc	20 juin 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
FOUILHÉ SAM-LAÏ Nathalie	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
GOUGET Barbara	8 février 2008 Démission le 1 juillet 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
GUENOT Dominique	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
GUERBET Michel	26 juin 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
HUYNH Cong Khanh	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
LAFON Dominique LD Médecin du travail pour Dassault Falcon Service	14 avril 2008
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LALÈRE Béatrice	26 juin 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
LAUDET Annie	20 septembre 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	

LEPOITTEVIN	Jean-Pierre	26 septembre 2008
	IP-SC Financement de thèses par L'Oréal jusqu'en 2006, par le COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) jusqu'en 2007 et par Firmenich jusqu'en 2009 au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I) Contrat en préparation avec le COLIPA au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)	
	IP-AC Conseil Sécurité produits chez L'Oréal donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I) Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
Analyse Anses :		
MACHEREY	Anne-Christine	26 juin 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	
MÉNÉTRIER	Florence	22 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	
PFOHL-LESZKOWICZ	Annie	12 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	
PICART	Daniel	26 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	
ROUDOT	Alain-Claude	26 mars 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	
SECRETAN	Béatrice	27 juin 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Anses :	/	

STEENHOUT Anne	20 février 2008
IP-CC Évaluation de projets pour Ectoc (2002) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)	
VB Participation à un programme de recherche « Méthodologie générale » financé par le CEFIC (European Chemical Industry Council) sur l'exposition des consommateurs, donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)	
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
TARDIF Robert	23 janvier 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	
THYBAUD Éric	4 juillet 2008 25 septembre 2008 18 novembre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Anses : /	

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS (DPI) DES MEMBRES DU GROUPE D'EXPERTS D'EVALUATION DES RISQUES ET DE L'EFFICACITE DES SUBSTANCES ET PRODUITS BIOCIDES AUPRES DE L'AFSSAPS PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

Conformément à l'article L. 5323-4 du Code de la santé publique, les experts du « groupe d'experts biocides » adressent au directeur général, à l'occasion de leur nomination, puis annuellement, une déclaration mentionnant leurs liens, directs ou indirects, avec les entreprises ou établissements dont les produits entrent dans le champ de compétence de l'agence, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les secteurs correspondants. Cette déclaration est actualisée à leur initiative dès qu'une modification intervient concernant ces liens ou que de nouveaux liens sont noués. La déclaration adressée par les experts est rendue publique².

Noms et prénoms	Profession	Synthèse DPI
M. AHO Ludwig-Serge	médecin hygiéniste	Aucun lien déclaré
Mme AUPEE Martine	médecin hygiéniste	Aucun lien déclaré
Mme BAEZA Armelle	maître de conférences en toxicologie	Aucun lien déclaré
M. CARNEVALE Pierre	entomologiste médical	Aucun lien déclaré
M. CHEVALIER Dany	maître de conférences en toxicologie	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
M. COUDORE François	professeur en toxicologie	Aucun lien déclaré
M. DARBORD Jacques Christian	pharmacien hygiéniste	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
M. de GENTILE Ludovic	praticien hospitalier en parasitologie	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
M. DEPAQUIT Jérôme	maître de conférences en entomologie médicale	Aucun lien déclaré
M. ERNOUF Dominique	maître de conférences en toxicologie	Aucun lien déclaré
Mme FESSARD Valérie	chargée de recherche en toxicologie	Aucun lien déclaré
Mme GOETZ Marie-Louise	médecin hygiéniste	Aucun lien déclaré
M. HUBERT François	toxicologue	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

² <http://www.afssaps.fr/Afssaps-media/Publications/Publications-institutionnelles>

M. IZRI Arezki	entomologiste médical, maître de conférences - praticien hospitalier	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
M. LABADIE Jean-Claude	médecin hygiéniste	Aucun lien déclaré
M. LACOUT Jean-Louis	professeur de chimie	Aucun lien déclaré
M. LEBLAIS Bruno	pharmacien conseiller technique nouveaux risques biologiques et chimiques	Aucun lien déclaré
Mme MIELCAREK Christine	responsable de pôle microbiologie	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
M. NIEL Philippe	pharmacien biologiste	Aucun lien déclaré
Mme ORANGE Nicole	professeur en médecine de microbiologie	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine
Mme ROMOND Marie-Bénédicte	professeur en pharmacie de microbiologie-virologie	Aucun lien déclaré
M. VERDEIL Xavier	médecin hygiéniste	Aucun lien déclaré
Mme VERJAT Delphine	pharmacien hygiéniste	Aucun lien déclaré

Expert rapporteur nommé en 2010 dans le cadre de la saisine DEET et co-exposition :

Noms et prénoms	Profession	Synthèse DPI
M. BELZUNCES Luc	toxicologue	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

Annexe 4 : Critères de neurotoxicité

En plus de son rôle primaire dans les fonctions psychologiques et cognitives, le SNC contrôle un large nombre de processus physiologiques au sein de l'organisme entier. Le SNC est très sensible et possède une capacité limitée de régénérescence ; il apparaît donc évident que la moindre perturbation anatomique, biochimique ou physiologique même infime, puisse entraîner l'apparition d'effets indésirables pour la santé humaine. Ainsi, il paraît très important de définir les paramètres influant sur le fonctionnement du SNC, notamment en termes d'évaluation de risque (U.S. EPA, 1998).

Il existe cinq principales catégories de critères d'évaluation de la neurotoxicité : neurotoxicités structurale ou neuropathologique, neurophysiologique, neurochimique, comportementale et développementale. Il est à noter que les critères exposés ici, correspondent à des critères d'évaluation de la neurotoxicité dans les études réalisées chez l'animal. Le tableau ci-dessous synthétise ces cinq catégories de critères et les exemples qui leur sont associés.

Principales catégories de critères neurotoxiques et exemples associés (d'après U.S. EPA, 1998)

Critères structuraux ou neuropathologiques

Changements morphologiques, incluant le changement de poids du cerveau

Changements histologiques des neurones ou de la glie (neuropathie, axonopathie, myélinopathie)

Critères neurochimiques

Altérations de la synthèse, relargage, recapture et des dégradations des neurotransmetteurs

Altérations dans le second messenger associé à la transduction du signal

Altérations sur les sites de fixation des enzymes régulant l'activité neuronale

Inhibition des enzymes

Augmentation des protéines de la glie chez l'adulte

Critères neurophysiologiques

Changements dans la vélocité, l'amplitude ou la période réfractaire de la conduction nerveuse

Changement dans le temps de latence ou l'amplitude du potentiel sensoriel

Changements au niveau de l'électroencéphalogramme

Critères comportementaux et neurologiques

Augmentation ou diminution de l'activité motrice

Changements au niveau du toucher, goût ou l'odorat

Changements dans la coordination motrice, faiblesse, paralysie, mouvements ou posture anormaux, tremblements, suractivité

Absence ou diminution dans la survenue, l'ampleur ou la latence des réflexes moteurs

Convulsions

Changements dans la proportion ou le temps de contrôle du comportement

Changements au niveau de l'apprentissage, mémoire et attention

Critères de développement

Apparition de comportements au cours du développement à des temps inadéquats

Changements dans la croissance ou l'organisation des éléments structurels ou neurochimiques

Il est à noter, pour l'interprétation des études de neurotoxicité, que ces indicateurs d'effets neurotoxiques listés dans le tableau ci-dessus sont dépendants de la dose à laquelle ces changements apparaissent et que la possibilité d'endommager d'autres systèmes de l'organisme contribue ou provoque des changements indirects (U.S. EPA, 1998).

Outre les critères neurotoxiques qui constituent la base de l'évaluation de la neurotoxicité, d'autres paramètres sont à prendre en compte tels que la toxicocinétique par exemple, en particulier dans le cadre de l'évaluation du risque cumulé étant donné l'exposition à plusieurs substances susceptibles de présenter des similitudes dans le métabolisme.

L'extrapolation des résultats des études chez l'animal à l'homme peut être considérablement modifiée en fonction des paramètres toxicocinétiques. Ainsi, les informations sur le temps de demi-vie, l'absorption, le métabolisme, l'excrétion et la distribution vers le système nerveux périphérique constituent un outil indispensable dans l'évaluation du risque. Il est possible de citer un exemple où les paramètres toxicocinétiques modifient clairement les effets de mélanges de substances neurotoxiques, issus d'un symposium d'un groupe de travail réunissant plusieurs experts en neurotoxicité et organisé par l'U.S. EPA (2000). Deux substances d'un mélange peuvent être métabolisées par les mêmes enzymes, en particulier des enzymes de détoxification. Ainsi, au moins l'une des substances pourrait ne pas être aussi rapidement métabolisée que lorsqu'elle est seule dans l'organisme et il sera observé une augmentation des effets due à l'accumulation de cette substance qui exerce son potentiel toxique plus longtemps que si elle était seule (U.S. EPA, 2000).

Une des particularités à prendre en considération au niveau de la toxicocinétique des agents neurotoxiques est représentée par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, certaines substances neurotoxiques sont susceptibles d'endommager la BHE. Si ces substances sont associées à d'autres substances ne passant habituellement pas la BHE, ces dernières, par l'intermédiaire de la brèche produite, vont pouvoir passer et induire des dommages au niveau du SNC qu'elles n'auraient pas provoqués si elles avaient été seules. En outre, la BHE forme un système particulier et peut constituer un biais pour l'extrapolation des résultats chez l'homme en raison des différences morphologiques inter- mais aussi intra-espèces.

D'autres considérations sont à prendre en compte pour l'évaluation de la neurotoxicité, considérations également valables pour l'évaluation d'autres types de toxicité. En effet, l'un des

points sensibles au niveau de l'interprétation des résultats, et notamment lors de l'extrapolation à l'homme, concerne les résultats des études *in vitro*.

Les études *in vitro* sont notamment proposées dans le cadre d'une alternative aux tests sur animaux. L'avantage de ces méthodes repose sur le fait qu'elles sont réalisables plus rapidement que les études *in vivo*, et peuvent donc fournir des réponses mécanistiques dans un délai relativement court. Cependant, les méthodes *in vitro* ne tiennent généralement pas compte de la distribution dans l'organisme, ni de la voie d'administration, ni du métabolisme de la substance. Enfin, dans le cas de l'évaluation d'un potentiel neurotoxique, ces méthodes ne peuvent pas reproduire le circuit complexe neuronal caractéristique d'un organisme entier. L'analyse des résultats des études *in vitro* doit donc être réalisée avec beaucoup de prudence (U.S. EPA, 1998).

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr