

20

Fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

Préambule

Les fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi) sont devenus ces dernières années un sujet de préoccupation pour les autorités sanitaires comme pour le grand public à la suite d'une alerte⁹⁶ lancée par un collectif de chercheurs et de médecins, incluant notamment des spécialistes de la fonction mitochondriale, des oncologues, et des toxicologues. Ce collectif s'appuie sur le mécanisme d'action de ces pesticides pour avancer l'hypothèse qu'ils pourraient, en raison de leur capacité à perturber la fonction mitochondriale des espèces non-cibles, présenter un risque pour la santé humaine ou l'environnement.

Cette hypothèse repose sur des publications scientifiques remontant au début des années 1990 qui montrent que des déficiences dans l'activité de la SDH, génétiquement déterminées, sont responsables de maladies humaines rares. Ces maladies, qui ont pour étiologie des dysfonctionnements mitochondriaux à l'origine de certaines formes de cancer et de pathologies neurologiques, sont décrites en détail dans ce chapitre. Ceci permet de mieux comprendre l'hypothèse selon laquelle l'inhibition chimique de cette enzyme pourrait avoir des conséquences néfastes sur la santé humaine dans le cas de l'exposition professionnelle ou environnementale aux fongicides SDHi.

Cette alerte a conduit à une autosaisine de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) dont l'objectif était de déterminer s'il y avait une alerte sanitaire au regard des données scientifiques disponibles. Le résultat de cette expertise, sur la base des données issues de la littérature scientifique, des évaluations européennes des substances et de la phytopharmacovigilance, concluait à l'absence

96. Bénit P, Chrétien D, Rak M, et coll. Une révolution urgente semble nécessaire dans l'usage des antifongiques. Tribune publiée dans *Libération* le 15 avril 2018. https://www.liberation.fr/debats/2018/04/15/une-revolution-urgente-semble-necessaire-dans-l-usage-des-antifongiques_1643539 [consulté le 17 octobre 2020].

« d'éléments en faveur de l'existence d'une alerte sanitaire qui conduirait au retrait des autorisations de mise sur le marché » des fongicides SDHi (Anses, 2019).

Afin d'apporter des éléments complémentaires pour éclairer et apprécier les dangers liés aux fongicides SDHi, l'expertise de l'Inserm consacre un chapitre spécifique à ces substances pour analyser l'ensemble des données scientifiques disponibles de façon interdisciplinaire. Parmi ces disciplines figurent *i*) l'expologie qui prend en compte des facteurs tels que la dégradation, la concentration ou la transformation des SDHi qui déterminent leur devenir et leur persistance dans l'environnement et donc l'exposition des populations, *ii*) la toxicologie qui permet d'aborder les effets d'une exposition à une substance sur des modèles *in silico*, *in vitro* et *in vivo* en tenant compte de la toxicocinétique des substances (processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion), et *iii*) l'épidémiologie afin d'aborder l'estimation du risque associé à l'exposition aux SDHi chez des populations qui peuvent différer en fonction de leur sensibilité, et où les effets peuvent parfois prendre des années à se manifester. Cette évaluation s'inscrit pleinement dans la mission de l'expertise collective Inserm d'apporter un éclairage scientifique indépendant sur des questions précises de santé, dans une perspective d'aide à la décision publique.

Introduction

Les pesticides sont largement utilisés en agriculture pour améliorer les rendements, la qualité et l'aspect des produits, en détruisant des organismes jugés nuisibles tels que des insectes (insecticides), des champignons (fongicides) ou des plantes adventices (herbicides). Ils agissent sur des fonctions vitales des organismes cibles, entraînant un dysfonctionnement létal ou une incapacité à se reproduire. Ils varient selon leur mode d'application (traitements aériens ou de semences) et peuvent être classés selon leur structure chimique (organochlorés, organophosphorés, thiocarbamates, pyréthri-noïdes, phénylamides, acides phénoxy-alcanoïques, triazines, phtalimides, pyridines...), ou leur organisme cible⁹⁷.

97. Des informations générales présentées dans l'introduction et l'annexe de ce texte sont reprises à partir de la thèse de docteur en médecine de Marie CADET. Sa thèse, menée sous la direction de Fabrice HERIN et intitulée « *Exposition professionnelle aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (toxicité aiguë et chronique). Une revue systématique de la littérature* », a été soutenue à l'Université Toulouse III en octobre 2019, disponible en ligne à : <http://thesesante.ups-tlse.fr/2810> [consulté le 11 mai 2020].

De par leur usage, les pesticides peuvent constituer une source de contamination environnementale de l'air, de l'eau et des sols, et par conséquent des faunes et des flores associées. Ces contaminations environnementales engendrent une exposition humaine qui varie aussi selon les propriétés chimiques des molécules et leurs modes d'absorption. L'évolution de l'agriculture en France (spécialisation des exploitations, mécanisation, recherche et développement...) a conduit à une augmentation de leur usage et, par conséquent, de la contamination de ces compartiments environnementaux, avec parfois une rémanence de nombreuses années après l'arrêt de leur utilisation en raison de la faible dégradation biotique ou abiotique de certaines molécules (Aubertot et coll., 2005).

Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (*succinate dehydrogenase inhibitors*, SDHi), qui font l'objet de ce chapitre, sont des fongicides utilisés pour lutter contre la prolifération de moisissures dans les productions agricoles. Les moisissures ont des effets néfastes sur la santé humaine et animale : elles sont responsables d'infections (généralement de type opportuniste) et peuvent provoquer des allergies, des irritations, et des symptômes respiratoires. Certaines synthétisent des métabolites (par exemple, aflatoxines, ochratoxines...) ayant des effets hépatotoxiques (notamment cancérogènes), immunotoxiques, néphrotoxiques ou neurotoxiques, en particulier dans le cas d'ingestion à long terme (Afssa, 2009). La contamination par les moisissures des cultures, des fruits et des légumes est un enjeu de santé publique (Lee et Ryu, 2017), particulièrement dans un contexte de réchauffement climatique de nature à favoriser leur développement (Battilani et coll., 2016). L'usage des fongicides est croissant et tend à s'élargir, d'autant que l'on découvre que certains possèdent, en plus de leurs propriétés antifongiques, des propriétés insecticides et antiparasitaires (Sakai et coll., 2012 ; Inaoka et coll., 2015 ; Ren et coll., 2018). L'usage important des fongicides a conduit au développement de champignons résistants, nécessitant une utilisation encore accrue, la production de nouvelles molécules ou l'association de plusieurs fongicides pour le traitement des cultures et produits de l'agriculture (Lucas et coll., 2015).

Il existe une grande variété de modes d'action des fongicides⁹⁸. Certains fongicides, dont plusieurs qui sont utilisés depuis des décennies, sont « multi-sites », c'est-à-dire qu'ils visent plusieurs cibles biochimiques au sein de la cellule fongique. Parmi cette catégorie figurent des fongicides minéraux à

98. Le FRAC, un organisme représentant l'industrie agrochimique pour des questions techniques et scientifiques relatives à la résistance aux fongicides, publie chaque année une classification (« *code list* ») des substances actives. Le document est disponible à : <https://www.frac.info/knowledge-database/downloads> [consulté le 11 février 2021].

base de soufre ou de cuivre (largement employés en agriculture biologique) ainsi que des fongicides organiques de synthèse, par exemple ceux appartenant à la famille des dithiocarbamates (mancozèbe, zirame...). La plupart des fongicides sont « uni-site » et agissent en induisant les réactions de défense de la plante hôte ou en perturbant un processus biologique essentiel à la vie cellulaire ; par exemple la respiration, le métabolisme des acides nucléiques, la dynamique du cytosquelette, la synthèse protéique, la transduction de signaux, la synthèse ou le transport des lipides, l'intégrité ou la fonction des membranes, la biosynthèse de la paroi cellulaire ou des stérols destinés aux membranes.

Environ un quart des fongicides recensés par le *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) ciblent la respiration cellulaire, un ensemble de réactions qui permettent la production d'ATP, la molécule clef de l'énergétique cellulaire, et qui ont lieu dans les mitochondries (la structure et la fonction des mitochondries sont présentées en détail dans l'addenda en fin de chapitre : paragraphe « Mitochondrie et chaîne respiratoire »). Ils sont représentés par environ 60 substances actives, classées en huit sous-groupes selon leur site d'action : agents affectant la biodisponibilité de l'ATP, inhibiteurs du complexe I, II ou III de la chaîne respiratoire (ce dernier constitué de trois sous-groupes ciblant différents sites) et les découplants ou inhibiteurs de la phosphorylation oxydative. Les fongicides visant le complexe II de la chaîne respiratoire exercent leurs effets en inhibant directement l'activité succinate : ubiquinone oxydoréductase, ci-après dénommée « succinate déshydrogénase » (SDH) et décrite ci-dessous.

La succinate déshydrogénase : enzyme clé de la chaîne respiratoire

Complexe II de la chaîne respiratoire

Les succinate-ubiquinone oxydoréductases (SQR) sont regroupées dans 5 classes (A à E) d'après le nombre de sous-unités hydrophobes et de groupements héminiques (Lemos et coll., 2002). La SQR mitochondriale (complexe II) appartient à la classe C avec un groupe hème et deux sous-unités transmembranaires. Le complexe II, localisé dans la membrane interne de la mitochondrie, participe à deux processus métaboliques interconnectés assurant la production d'énergie : la respiration cellulaire où elle permet le transfert d'électrons vers l'ubiquinone ou coenzyme Q, et le cycle de Krebs où elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate. Le complexe II est composé de quatre sous-unités protéiques SDHA, B, C, D et de quatre

cofacteurs d'assemblage SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3 et SDHAF4 tous exclusivement codés par le génome nucléaire (Ackrell, 2000 ; Moosavi et coll., 2019). Les facteurs d'assemblage SDHAF2 et SDHAF4 facilitent la maturation de la sous-unité SDHA, alors que les facteurs SDHAF1 et SDHAF3 participent à la réaction d'insertion du centre fer-soufre dans la sous-unité SDHB. Les sous-unités SDHA et B sont localisées dans le compartiment matriciel de la mitochondrie (figure 20.1). La SDHA humaine est une flavoprotéine de 72 kDa (664 acides aminés ; aa) comportant un groupe prosthétique flavine adénine dinucléotide (FAD) fixé par liaison covalente. La SDHB est une protéine fer-soufre de 32 kDa (280 aa) qui comporte trois centres fer-soufre ($[2\text{Fe-2S}]^{2+/1+}$, $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ et $[3\text{Fe-4S}]^{2+/0}$). Les sous-unités SDHC et SDHD sont des protéines de respectivement 19 kDa (169 aa) et 17 kDa (159 aa), qui possèdent un groupement hème enchâssé entre leurs hélices transmembranaires. Intégrées à la membrane interne mitochondriale, elles ancrent les sous-unités A et B dans la membrane, conférant à la SDH une structure tétramérique. Concernant les aspects mécanistiques du fonctionnement de la SQR mitochondriale (complexe II), le succinate est oxydé en fumarate par la SDHA, ce qui s'accompagne de la réduction du FAD en FADH_2 . Puis le FADH_2 transfère les électrons aux centres fer-soufre de la SDHB et le coenzyme Q est à son tour réduit. Les inhibiteurs spécifiques d'activité du complexe II se lient au site de liaison soit du succinate (SDHA), soit de l'ubiquinone (dénommé Q-site). Les composés agissant comme inhibiteurs compétitifs en se liant au Q-site ont été utilisés pour des études structurales du complexe II tels que le thénoyltrifluoroacétone (TTFA), et l'atpenin (Miyadera et coll., 2003 ; Sun et coll., 2005), groupe dans lequel se trouvent les fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase.

Chez l'être humain, quatre gènes codent les quatre sous-unités du complexe II : *SDHA* (15 exons, chromosome 5p15), *SDHB* (8 exons, chromosome 1p35), *SDHC* (6 exons, chromosome 1q23) et *SDHD* (4 exons, chromosome 11q23). Les sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription NRF-1, NRF-2 et Sp1, sont communs à la plupart des promoteurs des gènes nucléaires codant les composants de la chaîne respiratoire, ainsi qu'à certaines des enzymes anti-oxydantes, plusieurs des enzymes biosynthétiques hémiques et certains composants de l'appareil mitochondrial. Bien que les sites de liaison à NRF-1 se trouvent dans la région promotrice des quatre gènes SDH, les sites de liaison de NRF-2 et de Sp1 ne sont pas présents dans les promoteurs *SDHA* et *SDHC*, respectivement. Les promoteurs des gènes *SDHA* et *SDHB* possèdent également des éléments de réponse au fer (IRE ou « *Iron Responsive Element* ») dans leur région promotrice, ce qui suggère leur implication potentielle dans l'homéostasie du fer cellulaire et/ou mitochondrial (Brière et coll., 2005).

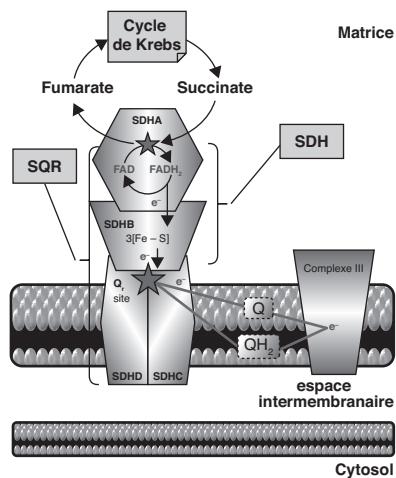


Figure 20.1 : Schéma récapitulant la structure et le fonctionnement de la succinate-ubiquinone oxydoréductase (SQR) mitochondriale (complexe II) (d’après Lemarie et Grimm, 2011)

Les sous-unités SDHA et SDHB catalysent l’oxydation du succinate en fumarate (une réaction faisant partie du cycle de Krebs ou *tricarboxylic acid cycle* ; TCA). Les électrons récupérés sont transférés au cofacteur FAD (associé à SDHA) puis aux centres fer-soufre (Fe-S, associé à SDHB), et conduisent à la réduction de l’ubiquinone (coenzyme Q ; CoQ) en ubiquinol (QH₂) par l’activité succinate CoQ réductase (SQR).
(Figure traduite de l’anglais)

Pathologies liées à des mutations dans des gènes codant pour la succinate déshydrogénase

Chez l’être humain, le déficit héréditaire dans l’une des sous-unités de la SDH dont les premiers cas ont été décrits dans les années 1990, est une cause de maladie mitochondriale, avec de façon fréquente des atteintes neurologiques de l’enfant. Il est également rapporté des cas de cardiopathies (Courage et coll., 2017), de leucodystrophies (Alston et coll., 2012), d’encéphalopathies (Ma et coll., 2014), ainsi que des cancers (Baysal et coll., 2000 ; Habano et coll., 2003 ; Neumann et coll., 2004 ; Malinoc et coll., 2012 ; Dwight et coll., 2013b ; Dwight et coll., 2013a ; Killian et coll., 2013 ; Letouzé et coll., 2013 ; Ni et coll., 2015 ; Bausch et coll., 2017 ; Caliό et coll., 2017 ; Lussey-Lepoutre et coll., 2017) (tableau 20.I).

Tableau 20.I : Maladies associées aux mutations dans les gènes codant les sous-unités de la SDH (d'après Bénit et coll., 2018)

Gène	Phénotype tumoral	Maladies non cancéreuses
<i>SDHA</i>	Adénome hypophysaire, Parangliome/Phéochromocytome, Carcinome rénal	Syndrome de Leigh, Atrophie optique, Ataxie, Cardiomyopathie, Encéphalopathie
<i>SDHB</i>	Parangliome/Phéochromocytome, Carcinome rénal, Tumeur gastro-intestinale, Syndrome de Carney-Stratakis, Syndrome de Cowden	Leucodystrophie
<i>SDHC</i>	Cancer du rein à cellules claires, Parangliome/Phéochromocytome, Syndrome de Carney-Stratakis	
<i>SDHD</i>	Parangliome/Phéochromocytome, Syndrome de Carney-Stratakis, Cancer du rein, Syndrome de Cowden	Encéphalomyopathie

Chez les patients présentant une mutation constitutionnelle hétérozygote sur l'un des gènes codant une sous-unité de la SDH (dans toutes les cellules de leur organisme) et porteurs d'une tumeur, l'inactivation complète de la SDH (dans la cellule cancéreuse) peut se produire suite à une perte d'hétérozygotie, le plus souvent liée à la perte de la région chromosomique incluant l'allèle sauvage (Gimenez-Roqueplo et coll., 2003 ; Burnichon et coll., 2010). Ces deux événements génétiques sont responsables d'une perte de l'activité SDH, conduisant à une accumulation massive de succinate (Pollard et coll., 2005).

Longtemps essentiellement associées à des maladies neurologiques (encéphalopathies, leucodystrophies) (Parfait et coll., 2000 ; Alston et coll., 2012 ; Ohlenbusch et coll., 2012) et des cardiomyopathies (Levitas et coll., 2010), les mutations des gènes *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, ou *SDHD*) ont été identifiées dans des formes familiales de phéochromocytomes (PCC) et parangliomes (PGL) au début des années 2000 (Baysal et coll., 2000 ; Neumann et coll., 2004). Les PCC et PGL sont des tumeurs rares, dérivées des cellules chromaffines, qui se développent dans les glandes médullo-surrénales et dans les ganglions des systèmes nerveux parasymphatique et sympathique au niveau de la tête, du cou et du pelvis (Gimenez-Roqueplo, 2006). Comparés aux autres cancers, les PCC et les PGL sont caractérisés par un déterminisme génétique très particulier. À ce jour, plus de 15 gènes de susceptibilité ont été identifiés incluant 2 oncogènes (*RET* et *HIF2A*) et des gènes suppresseurs de tumeur (*NF1*, *VHL*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *FH*, *TMEM127*, *MAX*, *MDH2*, *SLC25A11*, *GOT2*, *DNMT3A*). Plus de 40 % des patients porteurs d'un PGL ou un PCC possèdent une mutation germinale sur l'un de ces gènes (Dahia, 2014). De plus, les mutations constitutionnelles

affectant les gènes codant la SDHB ou la fumarate hydratase sont associées à un risque augmenté de métastases (Gimenez-Roqueplo et coll., 2003 ; Amar et coll., 2007 ; Castro-Vega et coll., 2014). Les gènes codant les sous-unités SDHB, SDHC et SDHD sont les gènes majeurs de susceptibilité des PGL et PCC. Sur une cohorte de 1 832 patients référencés avec un dépistage génétique en raison d'une histoire familiale de PGL ou PCC, 876 d'entre eux présentaient une mutation dans les gènes *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* pour 673, 43 et 160 cas, respectivement (Andrews et coll., 2018). Parmi les 876 mutations, il est observé une minorité de délétions ou de duplications et une majorité de mutations ponctuelles intragéniques dont 44 % de faux-sens. Il est à noter que la pénétrance des mutations dans le gène *SDHB* est incomplète. Par ailleurs, des mutations « perte de fonction » dans les gènes codant NF1 ou VHL, ainsi que des mutations activant les oncogènes RET, HIF2A ou HRAS ont été décrites au niveau somatique dans environ 30 % de ces tumeurs (Burnichon et coll., 2012 ; Favier et coll., 2012 ; Crona et coll., 2013 ; Oudijk et coll., 2014).

D'autres types de tumeurs impliquant des mutations *SDHx* ont été décrites, incluant des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (Miettinen et Lasota, 2014), des tumeurs rénales, des tumeurs thyroïdiennes, des mélanomes, des sarcomes, des tumeurs coliques, des neuroblastomes (Dubard Gault et coll., 2018 ; Gill, 2018), des tumeurs neuroendocrines pancréatiques, des ganglioneuromes et des triades de Carney (Bezawork-Geleta et coll., 2017).

Dans la pathologie cancéreuse, les déficits en SDH ne sont pas uniquement liés à l'inactivation d'une sous-unité de l'enzyme par mutation. Il est ainsi rapporté quelques cas de déficits en SDH chez des patients présentant une GIST ou un PGL sans aucune mutation dans les gènes *SDHx* mais impliquant une régulation négative du niveau d'expression de l'ARNm codant la SDHC *via* une hyperméthylation de l'ADN affectant le promoteur de ce gène dans la tumeur, mais pas dans les tissus sains (Urbini et coll., 2015 ; Casey et coll., 2019). La diminution du niveau d'ARNm peut également être liée à l'augmentation d'expression de microARN (miARN) ciblant les ARNm codant les différentes sous-unités de la SDH, notamment miR-210 (SDHD), miR-31 (SDHA) et miR-378 (SDHB) (Eichner et coll., 2010 ; Puisségur et coll., 2011 ; Kelly et coll., 2013 ; Tsang et coll., 2014 ; Lee et coll., 2016 ; Merlo et coll., 2017).

Enfin, dans le but de générer des modèles animaux de PGL et PCC, plusieurs groupes ont utilisé une approche d'inactivation génique pour inactiver les gènes codant les sous-unités de la SDH chez les souris (Piruat et Millán-Uclés, 2014 ; Lepoutre-Lussey et coll., 2016) ou les rats (Siebers et coll., 2018 ; Powers et coll., 2020). À ce jour, les résultats de ces études montrent

que les animaux porteurs d'une mutation hétérozygote ne présentent aucune prédisposition au cancer comparable à celle décrite chez l'être humain.

Les fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHi)

Les fongicides SDHi sont des agents à large spectre utilisés pour lutter contre les basidiomycètes, adélomycètes et ascomycètes. Ils sont représentés par une vingtaine de molécules partageant un même mécanisme d'action plutôt qu'une même structure. Néanmoins, ces fongicides SDHi sont tous des dérivés de structure amide (R1-CO-HN-R2) avec un groupement acide (R1) et un groupement amine (R2). Sept classes peuvent être définies sur la base de leur structure chimique et du groupement acide de la molécule : les benzamides (fluopyram, flutolanil), les furane carboxamides (fenfurame), les oxathiine carboxamides (carboxine, oxycarboxine), les pyrazole carboxamides (bixafène, penthiopyrade...), pyridine carboxamides (boscalide), thiazole carboxamides (thifluzamide) et pyrazine carboxamides (pyraziflumid). Les benzamides peuvent être subdivisés en deux sous-groupes sur la base du groupement amine : phényle benzamides (flutolanil) et pyridinyl éthylbenzamides (fluopyram). Les structures de quelques substances actives représentatives sont illustrées dans la figure 20.2.

Utilisation des SDHi en France

Le FRAC recense 23 substances actives SDHi (FRAC, 2020). Parmi elles, 12 sont autorisées en France en octobre 2020 avec des utilisations en traitement des parties aériennes, des semences, des sols ou des plants/tubercules (tableau 20.II). À noter que deux substances actives, la carboxine et le penflufène, sont autorisées sans que des spécialités commerciales les contenant ne soient autorisés en France ; au total, 42 formulations commerciales contenant de la carboxine et précédemment autorisées en France (premiers usages à la fin des années 1960) ont été retirées en 2018⁹⁹. Les produits correspondants ne sont plus distribués depuis mi-2019 et ne doivent plus être utilisés depuis fin janvier 2020. L'autorisation de quatre substances actives SDHi, le bénodanil, le fenfurame, le mépronil et l'oxycarboxine, a été retirée par le règlement (CE) n° 2076/2002 de la Commission du 20 novembre 2002¹⁰⁰

99. D'après la base de données E-Phy de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) disponible à l'adresse : <https://ephy.anses.fr/> [consulté le 11 mai 2020].

100. Cette information est donnée pour chacune de ces substances actives dans le *EU Pesticide Database*, disponible à l'adresse <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> [consulté le 11 mai 2020].

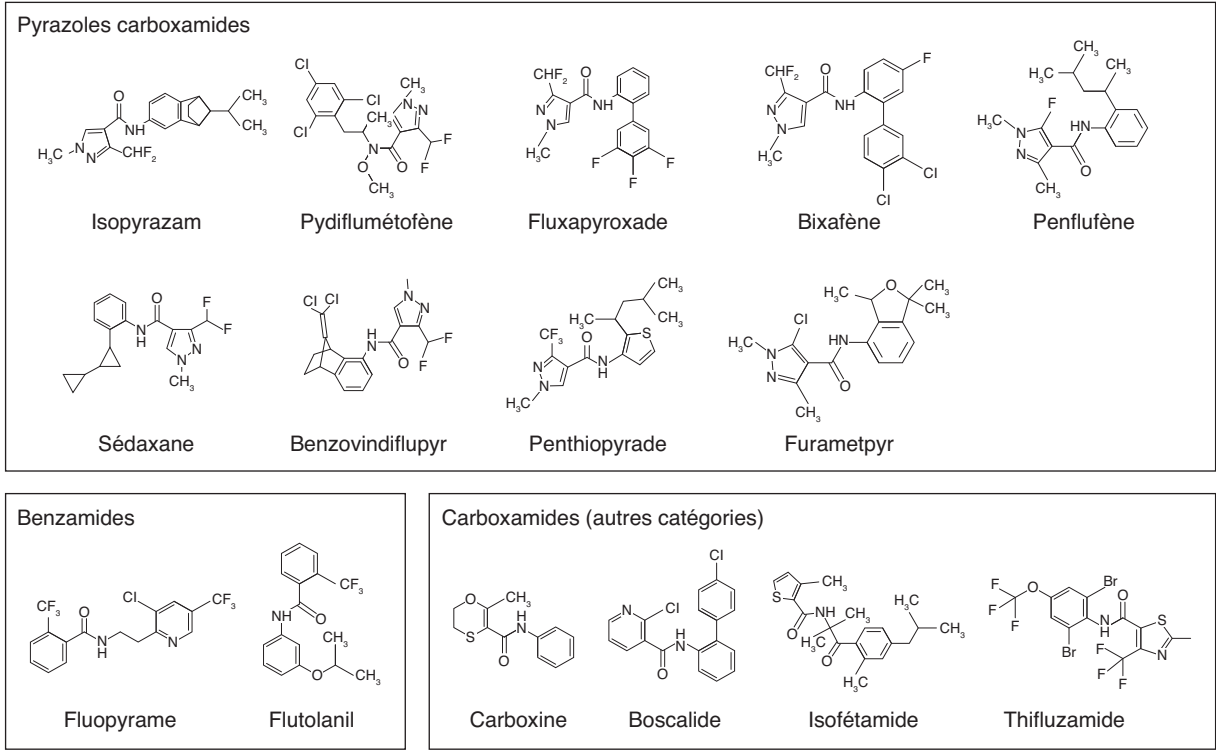


Figure 20.2 : Illustration des structures chimiques représentatives des principaux SDHi

Toutes ces molécules sont des dérivés de structure amide (R1-CO-HN-R2).

(tableau 20.III). Le bénodanil a été autorisé sur les cultures ornementales entre 1983 et 1987. Le fenfurame a été autorisé pour la protection des plaies de taille et le traitement des semences entre 1983 et 1997. Le mépronil a été autorisé pour le traitement des sols, le traitement des semences et les cultures légumières entre 1986 et 2003 et l'oxycarboxine a été autorisée sur les cultures ornementales entre 1973 et 2002¹⁰¹. Il existe neuf substances actives appartenant à la famille des SDHi non autorisées au niveau européen mais autorisées dans d'autres pays (voir addenda en fin de chapitre : tableau A20.I). Parmi ces substances actives, quatre sont en cours d'examen dans le processus d'autorisation de mise sur le marché au niveau européen : le pydiflumétofène, l'isoflucyprame, l'inpyrfluxame et le fluindapyr¹⁰². Deux substances actives SDHi, le furametpyr et le thifluzamide, ont fait l'objet d'une demande d'enregistrement préalable auprès de l'Agence européenne des produits chimiques (*European Chemicals Agency* ; Echa) au titre de la directive REACH¹⁰³. Elles ne sont pas autorisées pour une utilisation en tant que produit phytopharmaceutique. Enfin, aucun renseignement n'est disponible au niveau européen sur le pyraziflumid, qui a été homologué en mars 2018 par le Japon et dont l'examen par la réunion conjointe FAO/OMS sur les résidus de pesticides était prévu en 2020¹⁰⁴.

Selon les données de la Banque nationale des ventes de distributeurs, les ventes de SDHi en France se situent entre 500 et 700 tonnes de substance active par an depuis 2008¹⁰⁵. Le boscalide, qui représentait près de 600 tonnes en 2009 (Anses, 2019), reste le plus vendu en 2018 avec 230 tonnes, sa part ayant progressivement diminué au profit d'autres SDHi, notamment le

101. Les informations sur l'usage de bénodanil, fenfurame, mépronil et d'oxycarboxine proviennent de la base CIPA (Compilation des index phytosanitaires ACTA), un outil du programme Matphyto disponible à l'adresse <http://matphyto.acta-informatique.fr/> [consulté le 1^{er} avril 2020].

102. L'avancée des procédures d'autorisation de mise sur le marché peut notamment être suivie au travers de l'agenda et des résumés des réunions du Comité permanent des végétaux, des animaux, des denrées alimentaires et de l'alimentation animale, section produits phytopharmaceutiques, à l'adresse

https://ec.europa.eu/food/plant/standing_committees/sc_phytopharmaceuticals_en [consulté le 1^{er} avril 2020]. Ainsi, les résumés des réunions du 11-12 juillet 2016, du 19-20 juillet 2018, du 20-21 mai 2019 et du 16-17 juillet 2019 font respectivement part de l'admissibilité des dossiers du pydiflumétofène, de l'isoflucypram, de l'inpyrfluxame et du fluindapyr. Le pydiflumétofène, pour lequel la procédure est la plus avancée, était récemment à l'agenda des réunions du 21-22 octobre 2019 et du 5-6 décembre 2019 suite à l'avis rendu par l'Efsa en septembre 2019 (Efsa, 2019).

103. Le furametpyr et le thifluzamide ont été préenregistrés le 31/05/2018 (<https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/pre-registered-substances>) [consulté le 1^{er} avril 2020].

104. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/2020_Call_for_data_Final.pdf [consulté le 10 juin 2020].

105. <https://www.data.gouv.fr/en/datasets/ventes-de-pesticides-par-departement/> [consulté le 10 juin 2020].

fluopyram, le fluxapyroxade, et le bixafène, avec respectivement 185, 161 et 97 tonnes de substance active vendues en 2018.

D'après les données des enquêtes « Pratiques culturales » réalisées par le ministère français de l'Agriculture et de l'Alimentation¹⁰⁶ (qui donnent des informations sur les utilisations de substances actives hors traitements de semence), les SDHi sont utilisés sur des cultures diverses. Ainsi, pour les années enquêtées, le boscalide est appliqué au moins une fois sur environ 80 % des surfaces de colza (données 2014), 51 % des surfaces de carottes (données 2013), 30 % des surfaces de fraises, salades (données 2013) et pommes (données 2012), 20 % des surfaces de vigne (données 2014) (11 % en 2011), melons et poireaux (données 2013), et 10 % des surfaces de blé tendre et orge (données 2014) (30 % en 2011). Le fluxapyroxade est associé à 38 % des surfaces en blé tendre traitées avec le moins une fois en 2014 et 24 % des surfaces en orge la même année. Le bixafène est associé à 38 % des surfaces en orge traitées au moins une fois en 2014 et 22 % des surfaces en blé tendre la même année. Ces données (obtenues sur un échantillon de parcelles agricoles) ne montrent pas de surfaces traitées avec le fluopyram (surtout vendu après 2014, date de la dernière enquête qui était disponible début 2019), le sédaxane, le benzovindiflupyr ou le penthiopyrade (Anses, 2019).

Parmi les 149 spécialités commerciales autorisées en France¹⁰⁷ contenant une substance active SDHi, la plupart le sont au titre de leur seule fonction fongicide. Deux spécialités commerciales contenant le fluopyram comme unique substance active sont autorisées également pour leur fonction nématocide¹⁰⁸. Quatre spécialités contenant du boscalide en association avec la pyraclostrobine (famille des strobilurines), sont autorisées à la fois pour leur fonction fongicide et pour leur fonction de régulateur de croissance¹⁰⁹. La littérature scientifique récente montre que le complexe SDH représente une cible pour la sélection de nouveaux insecticides (Ren et coll., 2018), et nématocides utilisés en médecine vétérinaire (Sakai et coll., 2012 ; Inaoka et coll., 2015). En effet, la résistance aux nématocides a abouti à des résistances, voire des multi-résistances, chez les animaux et donc la recherche de nouveaux principes actifs ciblant le complexe SDH a été entreprise (Inaoka et coll., 2015 ; Myung et Klittich, 2015 ; Mathew et

106. <http://agreste.agriculture.sg-ppd.maaf.ate.info/enquetes/pratiques-culturales/a-propos-des-enquetes-pratiques/> [consulté le 2 septembre 2020].

107. Autorisations en vigueur le 10 juin 2020, d'après le site : <https://ephy.anses.fr>

108. Il s'agit du Velum Prime (<https://ephy.anses.fr/ppp/velum-prime>) et du Vecalitepi (<https://ephy.anses.fr/ppp/vecalitepi>) [consulté le 2 septembre 2020].

109. Il s'agit de l'Astrial DG (<https://ephy.anses.fr/ppp/astrial-dg>), du Varium (<https://ephy.anses.fr/ppp/varium>), du Stelair (<https://ephy.anses.fr/ppp/stelair>) et du Racazeliu (<https://ephy.anses.fr/ppp/racazeliu>) [consulté le 2 septembre 2020].

coll., 2016). En médecine humaine, un fongicide SDHi (ME1111) pour le traitement de la mycose des ongles a été proposé (Takahata et coll., 2016), ainsi qu'un médicament à activité anti-tumorale (lonidamine) (Nath et coll., 2016) mais sans autorisation de mise sur le marché à ce jour en France.

Tableau 20.II : Principaux types d'usages des fongicides SDHi autorisés en France

Substances actives (SA)	Principaux types de traitement	Cultures	Spécialité contenant la SA autorisée en France	Date de la 1 ^{re} autorisation en France d'une spécialité contenant la SA
Benzovindiflupyr	Parties aériennes	Céréales, terrains de golf	Oui	22/07/2016
Bixafène	Parties aériennes	Céréales	Oui	15/08/2011
Boscalide	Parties aériennes	Céréales, vigne, arboriculture, crucifères oléagineuses, tournesol, légumes	Oui	14/06/2005
Carboxine	Semences	Céréales	Non	01/12/1968
Fluopyram	Parties aériennes	Céréales, vigne, arboriculture, cultures légumières, oléagineux, banane, terrains de golf	Oui	15/10/2013
Flutolanil	Semences	Pomme de terre	Oui	01/06/1992
Fluxapyroxade	Semences et parties aériennes	Céréales, arboriculture, légumes	Oui	04/10/2011
Isofétamide	Semences et parties aériennes	Vigne, arboriculture, crucifères oléagineuses, pêches, prunes, abricots, cerises, laitues	Oui	10/08/2018
Isopyrazam	Parties aériennes	Plantes ornementales	Oui	18/12/2017
Penflutène	Parties aériennes	Céréales (blé, orge), légumes, riz	Non	–
Penthiopyrade	Parties aériennes	Céréales, tomates, fruits à pépins, concombres, courgettes, aubergines, cucurbitacées	Oui	27/11/2014
Sédaxane	Semences	Céréales et maïs	Oui	01/07/2011

Sources : Anses, 2019 ; *Pesticide Properties DataBase* (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> [consulté le 14 mai 2020]) ; rapports Efsa et Echa (*EU Pesticide Database* : <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> [consulté le 14 mai 2020]). Les données correspondent aux règlements en vigueur à la date de consultation des bases de données.

Tableau 20.III : Principaux types d’usages des fongicides SDHi anciennement autorisés en France

Substances actives	Cultures	Dates d’autorisation d’utilisation	Durée d’utilisation
Bénodanil	Cultures ornementales	1983 à 1987	4 ans
Fenfurame	Plaies de taille (cultures fruitières, viticulture), traitement de semences	1983 à 1997	14 ans
Mépronil	Cultures légumières, traitement de sols, traitement de semences	1986 à 2003	17 ans
Oxycarboxine	Cultures ornementales	1973 à 2002	29 ans

Source : Base CIPA (Compilation des Index phytosanitaires ACTA), un outil du programme Matphyto disponible à l’adresse <http://matphyto.acta-informatique.fr/> [consulté le 14 mai 2020].

Contamination des milieux et des denrées alimentaires

De par la diversité de leurs usages, les SDHi peuvent être retrouvés comme contaminants dans les denrées alimentaires ainsi que dans différents compartiments environnementaux (air, sols et eaux).

Surveillance dans les différents milieux

Concernant la contamination de l’air ambiant en France, le boscalide est le seul fongicide SDHi parmi 321 substances actives recherchées dans le cadre d’un programme national de mesures des résidus de pesticides dans l’air mené par les Associations agréées de surveillance de la qualité de l’air (AASQA). Les résultats pour la période 2002-2017, obtenus à partir de 6 837 prélèvements effectués sur 176 sites en France métropolitaine et outre-mer, sont compilés dans la base PhytAtmo¹¹⁰. Le boscalide, qui n’a été recherché qu’à partir de 2012, a été détecté dans 95 prélèvements sur 2 528, soit un taux de détection de 3,8 % avec une concentration moyenne de 0,087 ng/m³ (maximum 0,532 ng/m³). Le boscalide a été recherché sur 50 communes et détecté sur 14 d’entre-elles (28 %).

Une étude récente sur les résidus de pesticides dans les terres agricoles en Europe a montré que le boscalide est détecté dans 27 % des 317 échantillons testés à une concentration médiane de 0,04 mg/kg (maximum 0,41 mg/kg) (Silva et coll., 2019). Une autre étude plus restreinte menée en Allemagne sur des sols sableux a détecté le boscalide, 3 ans après son application, à une concentration moyenne de 0,2 µg/kg (Karlsson et coll., 2016). La demi-vie (DT₅₀) des fongicides SDHi dans les sols varie selon les substances actives,

110. <https://atmo-france.org/les-pesticides/> [version du 29 avril 2020 ; consulté le 16 juin 2020].

les types d'études (études de laboratoire ou de terrain), les conditions environnementales (température, humidité) et les types de sol. Dans le rapport Anses de 2019, le groupe d'experts a compilé les données sur les DT_{50} des fongicides SDHi dans les sols à partir des évaluations de risques publiées par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (*European Food Safety Authority* ; Efsa). Ont été rapportées les données obtenues sur l'ensemble des substances actives autorisées au niveau européen en janvier 2019 (à l'exception du penflufène). Les valeurs les plus faibles sont retrouvées pour la carboxine avec une DT_{50} moyenne de 0,28 jours (DT_{50} maximum 11 jours), l'isofétamide avec 37 jours et le sédaxane avec 100 jours. La persistance des autres substances SDHi est plus élevée comme par exemple le benzovindiflupyr, le flutolanil et le bixafène avec des DT_{50} respectivement de 184, 190 et 203 jours. Dans le dernier rapport d'évaluation européenne du boscalide, les DT_{50} rapportées sont de 108 à 384 jours à partir des études de laboratoire (moyenne 232 jours), et de 27 à 208 jours dans les études de terrain (C.E., 2008). Des valeurs du même ordre (entre 182 et 572 jours) ont été rapportées dans des dossiers de l'agence américaine de la protection de l'environnement (EPA, 2010). Enfin, des données sont disponibles pour quelques fongicides SDHi qui font l'objet d'une demande d'autorisation au niveau européen, dont l'inpyrfluxame avec une demi-vie dans les sols de 121 à 1 720 jours (EPA, 2020), l'isoflucyprame avec une demi-vie de 224 à 630 jours dans les études de laboratoire et de 16,5 à 177 jours dans les études de terrain (Echa, 2018), et le pydiflumétofène avec une demi-vie moyenne de 1 334 jours (maximum de 8 540 jours) (Anses, 2019). La quasi-totalité des fongicides SDHi répondent donc aux critères d'une substance dite « persistante » dans les sols selon la réglementation européenne¹¹¹ et leur utilisation à long terme peut ainsi conduire à leur accumulation, un phénomène qui a été montré par modélisation pour le boscalide (JMPR, 2009).

Les aquifères sont le réceptacle final de nombre de pesticides, ainsi, en France en 2013, des pesticides ont été détectés dans plus de 90 % des points de suivi des cours d'eau métropolitains par les agences de surveillance de l'eau (Commissariat général au développement durable, 2015). Les molécules les plus fréquemment détectées dans les cours d'eau (eau de surface) sont des herbicides. Parmi les 15 molécules les plus fréquemment détectées en 2013, le boscalide est en 8^e position. Il est le seul fongicide de ce top 15. Le taux de détection est inférieur à 20 % en 2012 et 2013. Parmi les 1 580 points de surveillance le concernant, aucun n'a dépassé le seuil d'écotoxicité

111. Une demi-vie dans le sol supérieure à 120 jours. Règlement (CE) n° 1107/2009 du 21/10/09 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE.

(11,6 µg/l)¹¹². La plupart des autres SDHi n'étant pas recherchés, la présence de ces molécules dans les hydrosystèmes n'est pas connue (Commissariat général au développement durable, 2015).

Surveillance dans les denrées alimentaires (végétales ou animales)

D'après le rapport de l'Anses (2019), les substances SDHi faisant l'objet d'une surveillance dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine en France sont : le boscalide, le flutolanil, la carboxine, le bixafène, le fluopyram, le fluxapyroxade, le penthiopyrade et le benzovindiflupyr. Les résultats des programmes de surveillance et de contrôles mis en œuvre par les ministères de l'Agriculture et de la Consommation entre 2013 et 2016 montrent que le boscalide est quantifié¹¹³ dans 4,4 % à 8,7 % des échantillons de denrées prélevées à la distribution et dans 9,2 % à 12,7 % de denrées directement à la production. Concernant le flutolanil, le taux de quantification est de 0,02 % pour les denrées distribuées, et de 0,7 % pour les denrées à la production. Un seul dépassement de la limite maximale de résidus (LMR) est constaté sur un échantillon de carotte issu des denrées prélevées à la distribution. La carboxine n'a pas été quantifiée dans les denrées prélevées à la distribution et l'a été une seule fois sur les denrées à la production (sur 800 à 1 400 analyses annuelles) sans dépasser la LMR. Concernant les autres substances, le bixafène et le fluopyram sont quantifiés dans moins de 2,5 % des échantillons (sans dépassement de la LMR sauf pour un cas pour des kiwis et le fluopyram), le fluxapyroxade, le penthiopyrade et le benzovindiflupyr ne sont pas quantifiés.

Le boscalide a été mesuré dans des études de l'alimentation totale française menées par l'Anses dont l'EAT2 réalisée entre 2006 et 2011, et aussi plus récemment avec la carboxine, le flutolanil et le mépronil dans l'EATi, réalisée entre 2010 et 2016 et qui portait sur l'alimentation infantile. Dans l'EAT2, le boscalide a été quantifié dans 20 % des échantillons de fruits (n = 75) à des concentrations comprises entre 0,01 et 0,09 mg/kg et dans 1,5 % des échantillons de légumes (n = 263) à des concentrations comprises entre 0,03 et 0,250 mg/kg, sans aucun dépassement de la LMR (Nougadère et coll., 2012). Dans l'EATi, le boscalide a été quantifié dans 5 sur 305 des produits analysés (1,6 %) à des taux faibles, de l'ordre de 0,001 mg/kg, alors

112. Valeur guide environnementale (VGE) pour les eaux douces non destinées à la production d'eau potable. L'Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) indique pour le boscalide une VGE de 11,6 µg/l (moyenne annuelle)

<https://substances.ineris.fr/fr/substance/cas/188425-85-6/3> [consulté le 24 juin 2020].

113. Concentration égale ou supérieure aux taux de quantification équivalent habituellement à 3 fois le taux de détection.

que la carboxine, le flutolanil et le mépronil n'ont pas été quantifiés (Nougadère et coll., 2020).

Au niveau européen, l'Efsa compile les données des programmes de contrôle nationaux menés par les États membres de l'UE, l'Islande et la Norvège. Concernant les données de 2018 (Efsa, 2020), 16 substances actives SDHi ont été étudiées (tableau 20.IV) : le boscalide et le fluopyram sont quantifiés dans respectivement 8,96 % et 6,75 % des échantillons analysés, un groupe de 7 substances sont quantifiées dans moins de 0,5 % des échantillons (le benzovindiflupyr, le bixafène, la carboxine, le flutolanil, le fluxapyroxade, l'isopyrazam et le penthiopyrade) et 7 substances ne sont quantifiées dans aucun des échantillons (le bénodanil, le fenfurame, l'isofétamide, le mépronil, l'oxycarboxine, le penflufène et le sédaxane). Seul le boscalide dépasse sur certains échantillons la LMR : sur 75 008 échantillons analysés pour cette substance, 61 (0,08 %) dépassent la LMR (8 sont des produits d'origine européenne, 53 d'origine extra-européenne).

Tableau 20.IV : Analyse des niveaux de résidus de pesticides SDHi dans les aliments sur le marché européen : nombre d'échantillons analysés et nombre de quantifications

Substance active	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de quantifications (> LQ)	% de quantification	Nombre de pays concernés
Bénodanil	9 689	0	0	7
Benzovindiflupyr	11 841	1	0,01	10
Bixafène	40 458	11	0,03	26
Boscalide	75 008	6 720	8,96	30
Carboxine	52 926	1	0	27
Fenfurame	6 713	0	0	4
Fluopyram	61 161	4 131	6,75	30
Flutolanil	61 478	18	0,03	28
Fluxapyroxade	45 507	208	0,46	26
Isofétamide	1 409	0	0	1
Isopyrazam	32 079	3	0,01	17
Mépronil	37 440	0	0	21
Oxycarboxine	14 049	0	0	14
Penflufène	21 455	0	0	19
Penthiopyrade	33 021	23	0,07	20
Sédaxane	5 035	0	0	6

LQ : Limite de quantification. Source : Efsa, 2020

L'Efsa a également évalué les risques liés à l'exposition alimentaire chronique en prenant en compte la concentration moyenne mesurée de pesticides dans les différents aliments, la consommation journalière moyenne de ces produits par habitant et la dose journalière admissible de la substance (DJA). Ces calculs ont été réalisés pour 182 pesticides (ou types de pesticides) dont 2 substances SDHi. L'exposition chronique au boscalide est estimée entre 1,6 % et 2,5 % de la DJA (selon un scénario minorant ou majorant) et l'exposition au fluopyram est estimée entre 0,91 % et 4 % de la DJA (selon les mêmes scénarios).

Enfin, une étude académique a examiné les résidus de plusieurs fongicides dont le boscalide dans les vins de différents pays. Le boscalide a été retrouvé dans 19,2 % de 250 vins testés à une concentration maximale de 0,136 mg/l (moyenne 0,03 mg/l) (Esteve-Turrillas et coll., 2016).

Biosurveillance humaine et sources d'exposition

L'Anses indique qu'il n'existe pas de données de biosurveillance humaine pour les SDHi, ces molécules n'ayant notamment pas été identifiées comme prioritaires lors de l'établissement de la liste des substances à inclure dans le programme national de biosurveillance (Anses, 2019).

Dans une étude académique analysant un échantillon de 311 femmes de la cohorte ELFE recrutées en maternité en 2011 en France métropolitaine, le boscalide a été détecté dans les cheveux de 195 femmes (63 %) avec une concentration médiane de 0,55 pg/mg de cheveux (Béranger et coll., 2018 ; Béranger et coll., 2020). Parmi un échantillon de 16 individus participant à une étude interventionnelle portant sur l'impact de l'alimentation d'origine biologique sur l'imprégnation urinaire aux États-Unis, aucune mesure réalisée avant et après l'intervention ne rapportait la présence du boscalide dans les urines (Hyland et coll., 2019).

Dans une étude académique préliminaire, chez les fleuristes en Belgique sur un faible effectif (n = 14), le boscalide a été détecté dans les urines à des concentrations comprises entre 0,49 et 0,82 µg/l (Toumi et coll., 2020). D'autres auteurs ont évalué, par modélisation, l'exposition à la carboxine par voie cutanée et par inhalation chez les personnes travaillant en floriculture sous serres en Colombie (Lesmes-Fabian et Binder, 2013) ou, dans une étude menée aux États-Unis, chez des personnes traitant les semences (Grey et coll., 1983).

Toxicocinétique

Les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'excrétion (ADME) des SDHi sont décrits dans les fiches techniques produites par les firmes pour les demandes de mise sur le marché et publiées par l'Anses, l'Echa et l'Efsa. Elles sont principalement obtenues chez le rat après une exposition par voie orale.

Ces études résumées dans le rapport de l'Anses en 2019, décrivent une absorption orale rapide et importante (> 80 %) pour la plupart des substances actives (benzovindiflupyr, bixafène, carboxine, fluopyram, isofétamide, penflufène, penthiopyrade, sédaxane, pydiflumétofène). Il est observé une large distribution dans le foie et le rein (benzovindiflupyr, bixafène, sédaxane, pydiflumétofène), ainsi que dans d'autres organes, glandes et tissus : tissus adipeux, thyroïde (boscalide) ; érythrocytes, surrénales, thyroïde et ovaires (fluopyram) ; surrénales (isopyrazam) ; érythrocytes, surrénales et tissus adipeux (penflufène). Le fluxapyroxade se retrouve dans le foie, tissu adipeux et surrénales.

Ces études montrent une absence d'accumulation et une excrétion rapide (benzovindiflupyr, bixafène, boscalide, carboxine, flutolanil, penflufène, sédaxane, pydiflumétofène), qui pour certaines substances est complète après 24 à 72 h (fluxapyroxade, isofétamide, isopyrazam, penthiopyrade) ou à une semaine (fluopyram). L'élimination est principalement par voie biliaire et/ou urinaire.

Elles indiquent que les SDHi sont métabolisés par :

- déméthylation, hydroxylation et glucurono-, sulfo-conjugaison : benzovindiflupyr ;
- déméthylation, hydroxylation et conjugaison (acide glucuronique et glutathion) et minoritairement par clivage de la fonction amide : bixafène ;
- hydroxylation du noyau biphenyle et glucurono-, sulfo- et glutathion-conjugaison : boscalide ;
- déméthylation, hydroxylation, oxydation puis glucurono-, sulfo- et glutathion-conjugaison : sédaxane ;
- clivage de la molécule conduisant d'une part au métabolite majeur trichlorophénol et d'autre part à des métabolites pyrazolés. Autres voies : déméthylation, hydroxylation, oxydation puis conjugaison : pydiflumétofène ;
- N-déméthylation et hydroxylation de la chaîne alkyle suivie par une oxydation en acides carboxyliques et glucurono-conjugaison, oxydation du cycle thiényl et glutathion-conjugaison : penthiopyrade ;

- oxydation, hydroxylation, clivage de la fonction amide et glucurono-conjugaison : carboxine, fluopyram ;
- hydroxylation du noyau biphenyle, perte d'un atome de fluor, N-déméthylation, conjugaison et clivage minoritaire de la fonction amide : flutolanil, fluxapyroxade ;
- hydroxylation du groupement bicycle-isopropyle, oxydation, N-déméthylation et conjugaison : isopirazam ;
- hydroxylation, N-déméthylation, oxydation puis conjugaison : penflufène ;
- O-désalkylation, oxydation, hydroxylation puis conjugaison : isofétamide.

Conséquences biologiques d'une altération de la fonction de la succinate déshydrogénase

Une mutation d'une ou plusieurs sous-unités de la SDH engendre une perte de fonction en condition de normoxie avec pour conséquence primaire une accumulation de succinate dans la mitochondrie, susceptible d'entraîner une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS). À la suite de son accumulation intra-mitochondriale, le succinate peut migrer dans le compartiment cytosolique en utilisant un transporteur membranaire VDCA (*Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein 1*, ou pore anionique voltage-dépendant) et induire la mise en place d'un phénotype de pseudo-hypoxie par inhibition des enzymes permettant la dégradation de HIF-1 α , le facteur de transcription régulant la réponse à cette hypoxie (voir ci-dessous). De plus, l'excès de succinate induit des modifications épigénétiques avec pour conséquence la dérégulation de l'expression de centaines de gènes, notamment certains de ceux impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Succinate et production d'espèces réactives de l'oxygène

Bien que les complexes I et III de la chaîne respiratoire soient des sites majeurs de production de ROS, le complexe II peut également y participer suite au blocage de son activité. Ainsi lorsque le complexe II est perturbé au niveau des sous-unités de la SDH (voir aussi ci-dessous), l'oxydation du succinate et le transfert d'électrons au groupement flavine de la SDHA pourraient se produire normalement, tandis que le transfert ultérieur des électrons vers les centres fer-soufre de la SDHB et l'ubiquinone est altéré, favorisant la production de superoxyde par l'auto-oxydation du groupement flavine réduit par l'oxygène dans la matrice (Rustin et Rötig, 2002). La production

de ROS par ciblage du complexe II par des agents chimio-thérapeutiques serait dépendante des modifications du pH intracellulaire et mitochondrial matriciel, et entraînerait la mort cellulaire par apoptose (Lemarie et coll., 2011). Le stress oxydant peut être associé à des syndromes neurodégénératifs, comme la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou de Huntington (Ebadi et coll., 2001 ; Lin et Beal, 2006 ; Niedzielska et coll., 2016 ; Trist et coll., 2019). Il peut aussi faciliter la promotion et la progression tumorale (Liou et Storz, 2010) en altérant la signalisation cellulaire et en causant des dommages oxydatifs à l'ADN (Tamura et coll., 2014 ; Galadari et coll., 2017 ; Prasad et coll., 2017).

Des études fonctionnelles dans des modèles de levure présentant des délétions ou des mutations ponctuelles dans les orthologues des gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* humains ont pu démontrer que l'inactivation de la SDH est associée à une augmentation de la production de ROS qui s'accompagne d'une instabilité génomique (Smith et coll., 2007 ; Szeto et coll., 2007 ; Goffrini et coll., 2009). D'autres études suggèrent que des mutations dans les sous-unités B, C et D pourraient également influencer la production d'anion superoxyde au niveau du site de liaison de l'ubiquinone sur la SDHD (Guo et Lemire, 2003 ; Szeto et coll., 2007). Plus récemment, il a été montré que l'inactivation de la SDHC dans des cellules humaines d'hépatocarcinome conduit à une augmentation de la production de ROS (Li et coll., 2019). De manière similaire, dans des lignées cellulaires humaines d'hépatome Hep3B, de carcinome pulmonaire A549 et d'ostéosarcome dans lesquelles la SDHB a été inactivée par ARN interférence ou « pharmacologiquement » (par traitement avec le TTFa), on observe un stress oxydant associé à la stabilisation nucléaire du facteur de transcription HIF- α (*Hypoxia Inducible Factor alpha*) en conditions normoxiques (Guzy et coll., 2008). Dans des cellules de hamster exprimant une version normale ou une version mutée du gène *SDHC* humain, il se produit une augmentation des niveaux d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène qui s'accompagne d'une activation de la superoxyde dismutase et du métabolisme du glutathion, cohérente avec la mise en place des mécanismes de défense contre le stress oxydant. Ce phénomène est associé à un stress métabolique caractérisé par une augmentation de la consommation de glucose. L'ensemble de ces désordres sont prévenus par une réexpression du gène *SDHC* (Slane et coll., 2006). Enfin, l'inhibition de la SDH par l'atpenin A5, un inhibiteur pharmacologique du complexe II de la chaîne respiratoire, doté de propriétés antifongiques et nématocides (Selby et coll., 2010 ; Lee et coll., 2019), induit également un stress oxydant dans les cellules tumorales coliques humaines HT29 et DLD-1 mais pas dans des fibroblastes normaux (Paranagama et Kita, 2017). La production de ROS résultant d'un déficit en SDH peut également favoriser la

transduction d'un signal de stabilisation du facteur de transcription d'HIF-1 α en oxydant le Fe²⁺ en Fe³⁺, car le Fe²⁺ est un cofacteur critique des prolyl-hydroxylases responsables de l'hydroxylation d'HIF1 (Zhao et coll., 2017).

Succinate, HIF1 et pseudo-hypoxie

L'une des conséquences de l'accumulation de succinate dans le cytosol est l'inhibition de l'activité des HIF prolyl-hydroxylases (PHD) qui contrôlent la stabilité de HIF-1 α et donc le devenir du facteur de transcription HIF1 responsable de la réponse à l'hypoxie (Selak et coll., 2005). La fonction physiologique d'HIF1 est de favoriser l'adaptation des cellules à la fluctuation du niveau de dioxygène (O₂). En situation de normoxie, le complexe HIF1 est maintenu à un faible niveau grâce à sa dégradation régulière par le protéasome, après son hydroxylation par les PHD dont l'activité est dépendante du dioxygène.

Au cours de la tumorigenèse, l'accroissement du volume tumoral entraîne une hypoxie transitoire au centre de la tumeur, qui favorise la stabilisation d'HIF1 (dimère de HIF1 α et HIF1 β). Ce facteur de transcription sensible à l'hypoxie va alors stimuler l'expression des gènes impliqués dans la néovascularisation comme le VEGF (Bernaudo et coll., 2002) ou dans le transport du glucose et la glycolyse (Vander Heiden et coll., 2009) et favoriser une reprogrammation métabolique propice à la promotion et à la progression tumorale. Ce remodelage métabolique, connu sous le nom d'effet Warburg, constitue un marqueur du phénotype tumoral commun à la plupart des cellules cancéreuses. Il favorise la glycolyse aux dépens de l'activité du cycle de Krebs couplé à la chaîne respiratoire des mitochondries, pour fournir les métabolites nécessaires à une prolifération rapide des cellules cancéreuses, ainsi que les cofacteurs nécessaires à leur lutte contre le stress oxydant (Vander Heiden et coll., 2009). Le succinate est un inhibiteur compétitif des PHD (Xiao et coll., 2012 ; Her et coll., 2015 ; Peters et coll., 2015). En bloquant l'hydroxylation d'HIF1 par les PHD, une élévation du succinate pourrait induire la stabilisation de ce facteur de transcription même dans des conditions de normoxie, avec des conséquences sur le développement du phénotype tumoral.

Dans des tumeurs de type PGL et PCC présentant une augmentation du niveau de succinate liée à une inactivation complète de l'un des gènes SDH, il a été mis en évidence une surexpression d'HIF1 (Pollard et coll., 2005 ; Gimenez-Roqueplo, 2006), liée à une inhibition de l'activité des PHD par le succinate. C'est également le cas dans des cellules transfectées avec un siARN dirigé contre *SDHB* (cellules hépatiques Hep3b et cellules d'adénocarcinome

gastrique AGS) (Cervera et coll., 2009) et dans des fibroblastes de patients présentant une inactivation complète du gène *SDHA* (Brière et coll., 2005). HIF1 concourt à l'activation de processus favorables à la cancérogenèse, notamment par la promotion d'une reprogrammation métabolique propice à la prolifération cellulaire. Ces caractéristiques ont conduit à considérer que l'inactivation des gènes *SDHx* entraîne la mise en place d'un phénotype de pseudo-hypoxie et à qualifier ces gènes de suppresseurs de tumeur. On peut également noter que l'accumulation de succinate observée dans des macrophages humains THP1 en réponse à une exposition à l'inhibiteur pharmacologique du complexe II atpénin A5 est également associée à une augmentation du niveau d'HIF-1 α (Fuhrmann et coll., 2019).

Succinate et régulation épigénétique

Le succinate, comme le fumarate et le 2-hydroxyglutarate, appartient à la famille des « oncométabolites ». Une augmentation de leur concentration cellulaire entraîne une dérégulation de l'homéostasie métabolique au sein du cycle de Krebs qui favorise la reprogrammation métabolique propice à la cancérogenèse évoquée plus haut (Nowicki et Gottlieb, 2015).

Le succinate joue un rôle crucial dans les régulations épigénétiques, en particulier en inhibant l'activité de déméthylases de l'ADN (figure 20.3). La méthylation de l'ADN est une modification chimique qui affecte les bases C au sein de dinucléotides CpG. Cette modification épigénétique, lorsqu'elle affecte les régions promotrices des gènes, permet de contrôler l'activité des gènes dans différents tissus et en réponse à différents stimuli nutritionnels, hormonaux ou environnementaux, sans modifier la séquence primaire d'ADN. La méthylation de l'ADN affecte la structure de la chromatine et est fréquemment associée à une répression des gènes. Elle peut être réversée par des enzymes possédant une activité déméthylase de la famille TET (*ten-eleven-translocation*) qui catalysent l'oxydation des 5-méthyl-cytosines en 5-hydroxy-méthyl-cytosine. Ce signal moléculaire de déméthylation est alors associé à une activation de la transcription des gènes (Vasanthakumar et Godley, 2015). Le succinate est un inhibiteur des déméthylases de la famille TET, avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'ordre de 550 μ M (Laukka et coll., 2016), une valeur compatible avec le niveau de succinate dans les tumeurs *SDHx* qui peut atteindre plusieurs millimolaires (Pollard et coll., 2005 ; Xiao et coll., 2012). Son accumulation est donc susceptible de modifier la méthylation de l'ADN et il est connu que les altérations du profil de méthylation des gènes sont souvent impliquées dans le processus de cancérogenèse.

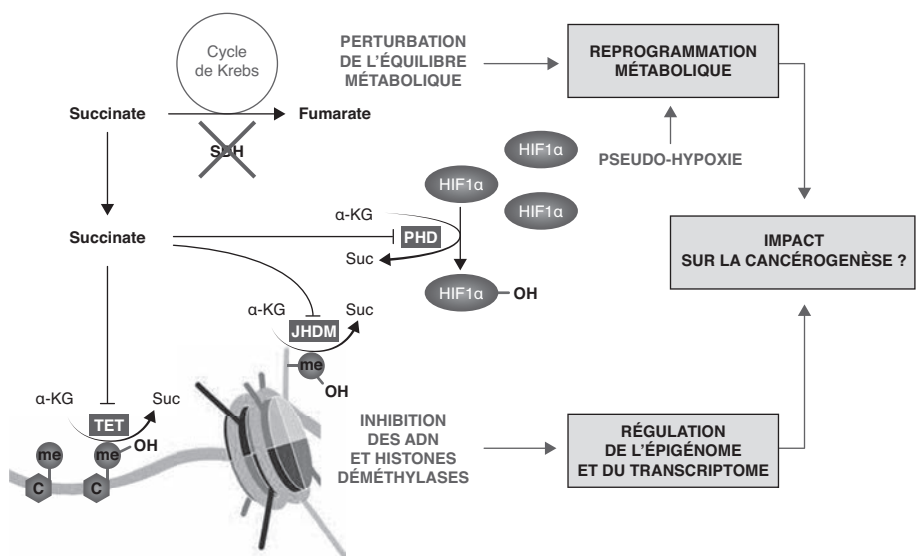


Figure 20.3 : Conséquences potentielles d’une accumulation de succinate sur la reprogrammation métabolique et la régulation de l’épigénome

L’accumulation de succinate pourrait entraîner une dérégulation de l’homéostasie métabolique, une inhibition des PHD (prolyl hydroxylases) responsables de la stabilisation d’HIF1 et de la mise en place d’une pseudo-hypoxie, et l’inhibition d’histones et d’ADN déméthylases responsables de la régulation de l’épigénome et par conséquent, du transcriptome. L’ensemble de ces événements moléculaires pourrait avoir un impact sur la cancérogenèse.

Dans les tumeurs PGL et PCC associées aux mutations des gènes *SDHx*, un phénotype hyperméthylé de l’ADN au niveau du génome entier a été observé, affectant les promoteurs de plus de 4 000 gènes. Ces altérations du méthylome ont des conséquences importantes sur le répertoire transcriptionnel des tumeurs, avec la diminution du niveau d’expression d’environ 200 gènes hyperméthylés. Parmi ces gènes, ont été identifiés des gènes suppresseurs de tumeurs ou encore des gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus crucial qui permet aux cellules cancéreuses de quitter leur tissu d’origine et de migrer vers d’autres organes pour former des métastases. L’extinction de ces gènes en réponse à l’hyperméthylation de leurs régions promotrices pourrait expliquer, au moins en partie, la dédifférenciation des cellules chromaffines au sein des PGL et PCC et le caractère invasif des tumeurs associées à une mutation du gène *SDHB* (Letouzé et coll., 2013). En accord avec cette hypothèse, l’inactivation génétique de *SDHB* dans des cellules chromaffines de souris entraîne une accumulation de succinate qui agit comme un inhibiteur compétitif des déméthylases de la famille TET, conduisant à une accumulation progressive de cytosines méthylées. Le phénotype hyperméthylé qui en résulte reproduit celui observé dans les tumeurs humaines portant une mutation *SDHB* à l’état homozygote et est

associé à des capacités migratoires augmentées des cellules chromaffines ainsi modifiées (Letouzé et coll., 2013).

Le succinate est aussi un inhibiteur compétitif des histones déméthylases dépendantes de l' α -cétoglutarate avec un IC_{50} de l'ordre de 0,8 mM (Xiao et coll., 2012). L'accumulation de succinate est donc également associée à une augmentation de la méthylation des histones (figure 20.3). Les histones sont les protéines formant les nucléosomes de la chromatine. Elles subissent des modifications post-traductionnelles qui modulent l'accessibilité de l'ADN, donc des gènes, à la machinerie transcriptionnelle. C'est principalement l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique des histones qui émerge des nucléosomes, qui subit ces nombreuses modifications post-traductionnelles. La nature de ces modifications est diverse incluant notamment la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la méthylation. Concernant ce dernier type de modulation, les histones peuvent être mono-, di-, ou triméthylés. La méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9 et H3K27, respectivement) est associée à une répression de la transcription.

Dans les tumeurs impliquant une inactivation de la SDH, plusieurs travaux ont montré que l'accumulation de succinate modifie l'épigénome via une hyperméthylation des histones. Ainsi, dans les tumeurs humaines associées à une inactivation du gène *SDHB*, les cellules chromaffines de souris et les cellules tumorales ovariennes de souris dans lesquelles le gène *Sdhb* a été inactivé, une augmentation du niveau de méthylation des histones H3K9 triméthylés et H3K27 di- et triméthylés a été mise en évidence (Letouzé et coll., 2013 ; Aspuria et coll., 2014). Dans les cellules embryonnaires rénales humaines HEK293T, l'inactivation de *SDHA* ou *SDHB* par ARN interférence (utilisation de siARN) entraîne une augmentation du niveau des histones H3K4 mono-, di- et triméthylés, et H3K79 diméthylés. Cette hyperméthylation des histones est retrouvée dans les cellules humaines d'hépatocarcinome Hep3B, de fibrosarcome HT1080 et de phéochromocytome de rat PC12 suite à une inhibition de la SDH par un traitement avec 0,5 mM de TTFA pendant 24 h (Cervera et coll., 2009), avec des profils d'hyperméthylation de l'histone H3 différents selon les lignées cellulaires utilisées.

Bien que les données sur l'inactivation partielle ou totale de la SDH par mutations génétiques soient plus étayées que celles sur l'inhibition chimique, il est important de noter que les inhibiteurs pharmacologiques de la SDH (notamment le TTFA, l'atpenin) ou la présence de succinate (notamment sous forme de diméthyl-succinate) entraînent, dans le contexte particulier d'expérimentations sur des modèles cellulaires, des effets similaires à ceux décrits dans le cas des altérations génétiques de la

SDH. En effet, ces molécules sont capables d'induire *in vitro* une pseudo-hypoxie par changement de l'activité de la PHD ainsi qu'un stress oxydant, une hyperméthylation des îlots CpG et une hyperméthylation des histones (Guzy et coll., 2008 ; Cervera et coll., 2009 ; Lemarie et coll., 2011 ; Wentzel et coll., 2017).

Succinate, SDH et transition épithélio-mésenchymateuse

La plupart des décès imputables aux tumeurs malignes solides (90 %) sont liés à l'apparition et la croissance de métastases disséminées responsables de dysfonctions d'organes vitaux. D'un point de vue mécanistique, la capacité d'une tumeur primaire à former des métastases requiert plusieurs étapes, incluant la capacité de dégrader la matrice extracellulaire, de migrer dans le flux sanguin, de s'ancrer puis de proliférer dans un tissu différent.

La transition épithélio-mésenchymateuse (*Epithelial-Mesenchymal Transition* ; EMT) constitue l'une des premières étapes nécessaires au processus métastatique. Ce phénomène dynamique et réversible repose sur des modifications morphologiques et fonctionnelles complexes de la cellule tumorale, nécessaires à l'acquisition d'un phénotype invasif (figure 20.4). L'EMT se caractérise par la perte des propriétés de polarité et d'adhérence caractéristiques des cellules épithéliales, et l'acquisition de propriétés de mobilité et d'invasion propres aux cellules mésenchymateuses (Thiery et coll., 2009).

Ce processus est caractérisé par de profonds changements transcriptionnels (Lamouille et coll., 2014) et épigénétiques (McDonald et coll., 2011 ; Tam et Weinberg, 2013), liés à un remodelage métabolique affectant le métabolisme du glucose, des lipides, de la glutamine et des nucléotides (Sciacovelli et Frezza, 2017). La connexion étroite entre l'EMT et le métabolisme mitochondrial a notamment été établie par la démonstration d'une signature moléculaire caractéristique de l'EMT dans des tumeurs porteuses de mutations dans des gènes codant des enzymes du cycle de Krebs, dont la SDH (Loriot et coll., 2012). Certains travaux mettent également en évidence que l'EMT peut être impliquée dans l'émergence de propriétés caractéristiques des cellules souches cancéreuses (Puisieux et coll., 2014 ; Ye et Weinberg, 2015), incluant la chimiorésistance avec une surexpression de gènes codant des pompes d'efflux de médicaments (Du et Shim, 2016), et la dormance tumorale (Giancotti, 2013).

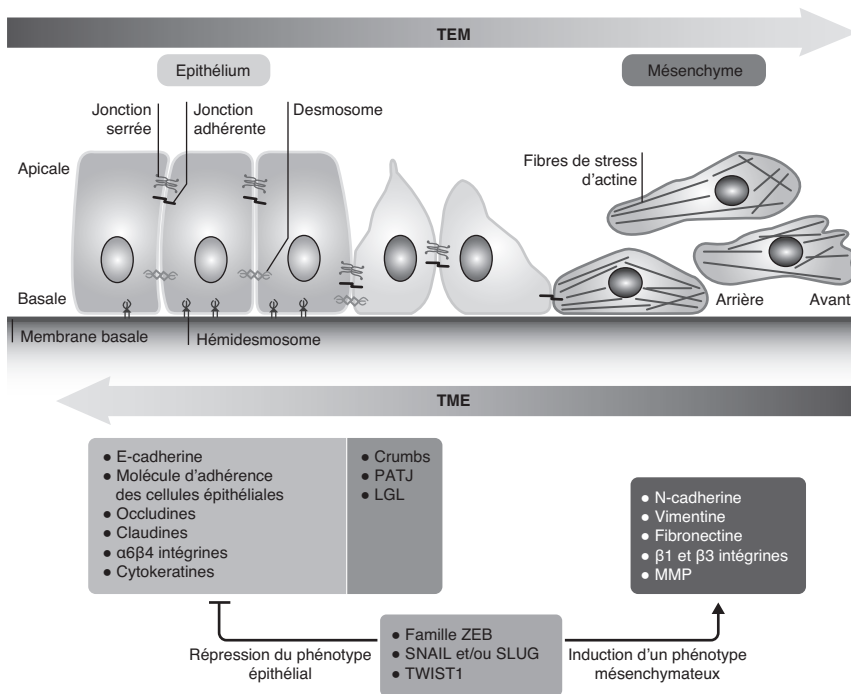


Figure 20.4 : Représentation schématique des modifications cellulaires intervenant lors de la mise en place de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (d'après Dongre et Weinberg, 2019)

Les cellules épithéliales présentent une polarité « baso-apicale » et sont maintenues entre elles par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. Elles sont liées à la membrane basale par des hémidesmosomes. Ces cellules expriment des molécules caractéristiques de l'état épithélial impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire. L'induction de la EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) conduit à l'expression des facteurs de transcription ZEB, SNAIL et TWIST, qui inhibent l'expression des gènes associés à l'état épithélial et activent simultanément l'expression des gènes associés à l'état mésenchymateux. Ces changements entraînent le désassemblage des jonctions intercellulaires et la disparition de la polarité. La perte progressive des caractéristiques épithéliales s'accompagne de l'acquisition d'un ensemble de caractéristiques mésenchymateuses avec une polarité « avant-arrière », un cytosquelette largement réorganisé et des marqueurs mésenchymateux.

TME : transition mésenchymo-épithéliale.
(Figure traduite de l'anglais)

Loriot et coll. ont montré que les PCC et les PGL métastatiques humains porteurs de mutations du gène *SDHB* sont invasifs et présentent une activation des facteurs de transcription Snail 1 et Snail 2 qui gouvernent la mise en place de l'EMT suggérant l'induction d'une EMT dans ces tumeurs (Loriot et coll., 2012). Confirmant cette hypothèse, l'inactivation du gène *SDHB* dans les cellules chromaffines de souris induit l'expression de ces facteurs de transcription et conduit à une augmentation des capacités migratoires, partiellement bloquée par la décitabine, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (Letouzé et coll., 2013 ; Loriot et coll., 2015). Le lien entre le déficit en *SDHB* et l'EMT a également été démontré dans le cancer colorectal, où l'inactivation

du gène *SDHB* favorise la migration et l'invasion cellulaires *via* un mécanisme impliquant le TGF- β et le facteur de transcription Snail1 (Wang et coll., 2016), ainsi que dans le cancer ovarien (Aspuria et coll., 2014).

Une autre observation est que les gènes *SDHA* et *SDHB* sont fréquemment sous-exprimés dans les carcinomes hépatocellulaires humains (Shimizu et coll., 2014). Chez les patients présentant des tumeurs hépatocellulaires, cette atténuation de l'expression de la SDH est associée à la progression tumorale et à une diminution de la survie des patients (Li et coll., 2019). Dans des cellules d'hépatocarcinome, l'inactivation du gène *SDHC* induit une augmentation du niveau de succinate et favorise la prolifération cellulaire et la mise en place d'une EMT, avec la diminution des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et zonula occludens-1) et une augmentation des marqueurs mésenchymateux (vimentine et N-cadhérine). Ces observations s'accompagnent d'une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales (Li et coll., 2019). De manière similaire, l'inactivation du gène *SDHB* dans les cellules d'hépatocarcinome Hep3B induit une EMT caractérisée par une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine, vimentine et des facteurs de transcription contrôlant l'EMT (Twist, Slug et Snail). La mise en place de cette EMT s'accompagne d'une augmentation des capacités de prolifération et de migration des cellules tumorales (Tseng et coll., 2018).

Bien que l'ensemble de ces études ne se soient pas spécifiquement axées sur l'accumulation de succinate comme médiateur de l'EMT, il a été récemment montré que le succinate, tout comme le fumarate, peut induire la suppression épigénétique de miARN de la famille miR-200 et leur induction ultérieure dans les cellules rénales épithéliales déficientes en *SDHB* (Sciacovelli et coll., 2016).

Données toxicologiques concernant les fongicides SDHI

Les contaminants environnementaux sont susceptibles de nuire à la santé humaine et à la biodiversité *via* divers mécanismes (par exemple *via* des effets génotoxiques, mutagéniques ou perturbateurs endocriniens). Les études épidémiologiques ont permis d'associer l'exposition à des polluants environnementaux à la survenue ou la progression de certaines pathologies mais les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués restent en grande partie inconnus.

Ces dernières années, il est apparu que l'exposition à des contaminants environnementaux incluant certains pesticides pouvait favoriser un dysfonctionnement mitochondrial. C'est le cas pour le paraquat (Tawara et coll.,

1996 ; Cochemé et Murphy, 2008), le manèbe (Zhang et coll., 2003 ; Domico et coll., 2006), et la roténone (Betarbet et coll., 2000 ; Navarro et coll., 2010) qui perturbent la respiration cellulaire en bloquant l'activité des complexes I et/ou III de la chaîne respiratoire des mitochondries et sont suspectés de jouer un rôle dans le développement de la maladie de Parkinson (Costello et coll., 2009 ; Tanner et coll., 2011 ; Wang et coll., 2011).

Malgré une littérature académique croissante portant sur les SDHi, les données publiées concernent essentiellement leur écotoxicité. Des données de toxicité sont essentiellement retrouvées dans les dossiers d'autorisation de mise sur le marché des substances actives communiqués par les firmes qui les commercialisent, mais ces rapports ne passent pas par une procédure d'évaluation indépendante par les pairs. Comme c'est souvent aussi le cas pour les études académiques, elles ne permettent pas d'accéder aux données brutes (c'est-à-dire les résultats primaires qui n'ont été soumis à aucun traitement ou transformation).

Une analyse de la littérature académique portant sur la toxicologie des SDHi implique la prise en considération des résultats obtenus à partir de diverses approches expérimentales (*in vitro* ou *in vivo*) et différents organismes modèles. Afin de mieux comprendre comment les SDHi interagissent avec le complexe II mitochondrial pour perturber son fonctionnement dans les différents organismes, les analyses moléculaires et structurales sont brièvement décrites ci-dessous. Ensuite, les études d'inhibition *in vitro* de l'activité SDH, puis les études de toxicité et de cancérogénicité sur les modèles animaux (rongeurs et poissons) sont analysées.

Inhibition de la succinate déshydrogénase : analyses structurales (*in silico*) et fonctionnelles (*in vitro*)

Structure protéique de la SDH et site de fixation des SDHi

L'analyse des séquences nucléotidiques des sous-unités de la SDH montre une identité/similarité très importante entre les espèces (champignons, levure, l'être humain), notamment pour SDHA et B et plus faible pour SDHC et D (Huang et Millar, 2013). Non seulement les séquences mais aussi les structures déterminées par cristallographie aux rayons X sont semblables et, en premier lieu, le site de liaison de l'ubiquinone et des fongicides SDHi (Q-site). L'étude de mutations spontanées ou induites (ciblées ou non) apporte des informations sur l'activité du complexe II mitochondrial. Le site de liaison du succinate est localisé dans la sous-unité SDHA et le Q-site implique des acides aminés des sous-unités SDHB, SDHC et SDHD (Cecchini, 2003 ; Lalève et coll., 2014).

Récemment, une analyse d'identité/similarité des séquences SDHx a été réalisée dans une étude expérimentale *in vitro* qui avait pour objectif d'explorer les effets potentiels des SDHi chez les espèces non-cibles. L'analyse bio-informatique des séquences d'acides aminés des sous-unités SDHB, SDHC et SDHD de 22 espèces a abouti à la même conclusion quant à un fort degré de conservation. Douze acides aminés sont importants pour la fixation des SDHi (figure 20.5), 5 d'entre eux sont identiques entre les espèces comparées alors que les autres sont différents mais les changements sont conservatifs (Bénit et coll., 2019).

L'identification de mutations qui confèrent un phénotype de résistance de champignons parasites aux fongicides SDHi, des approches par mutagenèse ciblée pour identifier les sites de liaison des SDHi ainsi que des données de cristallographie aux rayons X apportent des éléments pour déterminer la structure du complexe seul ou associé à un inhibiteur d'activité.

Parmi les mutations responsables d'un phénotype de résistance au boscalide, il est très souvent identifié chez *Botrytis cinerea* les mutations du gène *Sdhb* touchant les acides aminés Pro225 et His272 (Yin et coll., 2011) (dénommées ci-après SdhB-Pro225 et SdhB-His272 ; locus et acides aminés correspondant chez l'être humain ou le porc à respectivement SDHB-Pro197 et SDHB-His249). Une trentaine de mutations ont été identifiées comme responsables de la résistance aux fongicides et les plus fréquentes chez *B. cinerea* sont, comme précédemment, SdhB-Pro225 et SdhB-His272 avec de plus SdhB-Asn230 (Sierotzki et Scalliet, 2013), locus et acide aminé de ce dernier correspondant chez l'être humain (ou le porc) à SDHB-Asn202. Ces mutations sont pour partie dans la région du Q-site identifié en radiocristallographie (Yankovskaya et coll., 2003 ; Sun et coll., 2005). Il est intéressant de noter que des mutations de l'acide aminé SdhB-Pro225 chez *B. cinerea* (correspondant à SDHB-Pro197 chez l'être humain), conduisant à une résistance aux SDHi ont été retrouvées chez des patientes atteintes de PCC/PGL (Andrews et coll., 2018).

La structure cristallographique du complexe II de mitochondries de cœur de porc a été résolue ainsi que le complexe en présence du TTFA, un inhibiteur classique de la réduction de l'ubiquinone qui se loge dans le Q-site (Sun et coll., 2005). Le Q-site est formé par l'hélice 2L (SDHC ; aa 38-52), l'hélice 2S (SDHD ; aa 77-91) et les sites de liaison des complexes Fe-S (SDHB ; aa 166-175 et 214-219). Une similarité structurale entre le Q-site du complexe SQR d'*E. coli* et de mitochondries de porc renforce la notion de permanence structurale du complexe entre les organismes (Yankovskaya et coll., 2003 ; Sun et coll., 2005 ; Horsefield et coll., 2006 ; Ruprecht et coll., 2009). Cependant, peu de structures cristallographiques du complexe mitochondrial SQR ont été publiées et de nombreux articles portent sur des comparaisons de séquences non validées au plan d'une structure à résolution atomique. Ainsi si les

structures sont semblables, elles peuvent différer légèrement entre espèces avec des affinités différentes pour les inhibiteurs au site de liaison de l'ubiquinone.

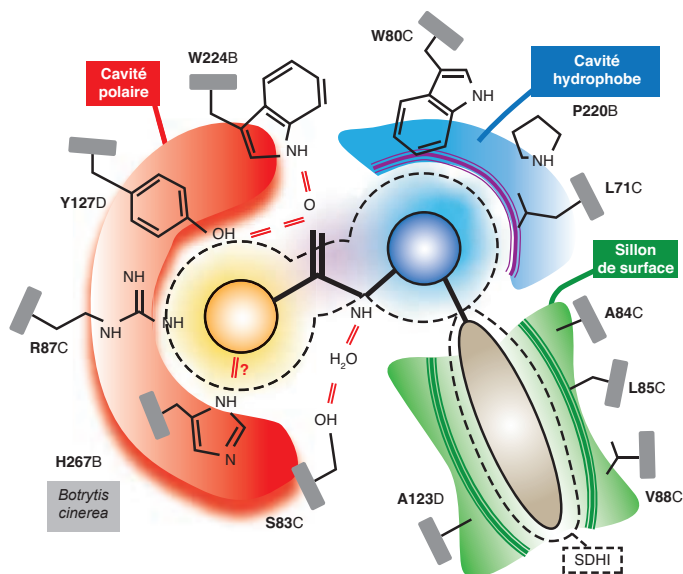


Figure 20.5 : Représentation schématique de l'interaction des SDHi avec le site de liaison de l'ubiquinone du complexe II mitochondrial (d'après Bénit et coll., 2019)

Les SDHi (représentés par la molécule entourée par la ligne pointillée) interagissent *via* leur groupement acide (en jaune) et amine (en bleu) avec des résidus d'acides aminés conservés (en gras) dans la cavité polaire (en rouge), la cavité hydrophobe (en bleu), ou le sillon de surface (en vert) des sous-unités SDHB, SDHC ou SDHD. À noter, la numérotation, qui diffère de celle dans le texte, est basée sur la séquence de *Botrytis cinerea*. (Figure traduite de l'anglais)

Inhibition in vitro de l'activité de la succinate déshydrogénase de différentes espèces par les SDHi

Plusieurs études ont mesuré des valeurs des constantes de liaisons des inhibiteurs dans le Q-site du complexe II chez différents organismes et les résultats permettent de vérifier expérimentalement l'hypothèse d'une absence de spécificité des SDHi.

Récemment, les IC_{50} de huit SDHi ont été mesurées dans des préparations enrichies en mitochondries obtenues à partir de cellules humaines, de lombric, d'abeille, et de champignon. Ces mesures montrent un potentiel inhibiteur des SDHi sur l'activité de la SDH, de l'ordre du micromolaire chez le champignon et l'être humain, avec des variations en fonction du SDHi utilisé (figure 20.6) (Bénit et coll., 2019). Cependant, il faut noter que la préparation des extraits varie en fonction de l'espèce, allant d'une purification

de mitochondries (*B. cinerea*, *Apis mellifera*), sans indication de critères de qualité des préparations mitochondriales, à un lysat (*Lumbricus terrestris*, *Homo sapiens*) et réalisée à partir d'une seule préparation par organisme.

Une autre étude a mesuré les valeurs d'IC₅₀ du flutolanil sur l'activité SDH entre l'ascaris et son hôte, le porc, et a montré qu'elles sont très différentes, respectivement de 0,058 µM et 45,9 µM alors qu'il y a conservation de la structure du complexe II (Inaoka et coll., 2015). Cette différence (facteur d'environ 800 fois) est expliquée par la liaison plus forte du flutolanil dans la structure de la SDH d'ascaris évaluée d'après des données cristallographiques (Inaoka et coll., 2015). D'autres études, publiées par des industriels des phytosanitaires, ont comparé les IC₅₀ des SDHi entre espèces. Nakano et coll. ont montré que les IC₅₀ du pyflubumide pour la SDH d'un acarien (*Tetranychus urticae*), du rat et de la truite présentent une variabilité importante, de l'ordre de 400 fois (Nakano et coll., 2015). Une deuxième étude a montré des différences d'IC₅₀ entre 7 800 et 17 700 fois entre la souris et deux champignons (*B. cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*) respectivement pour le pyraziflumid, mais cet article ne précise pas la nature des échantillons biologiques sur lesquels les mesures ont été réalisées (Kikutake et coll., 2020). Les études disponibles suggèrent donc que les valeurs d'IC₅₀ pourraient être très différentes d'une espèce à l'autre mais ne permettent pas d'évaluer objectivement la spécificité des SDHi vis-à-vis des champignons au regard d'espèces non-cibles. Cette caractérisation requiert des études supplémentaires rigoureuses, en particulier quant à la nature, l'homogénéité et la préparation des échantillons biologiques sur lesquels sont mesurées les IC₅₀.

La comparaison des IC₅₀ entre études est problématique en raison des facteurs influençant les résultats des essais d'activité enzymatique (nature des extraits, présence d'inhibiteurs, quantité de l'enzyme présente dans la réaction...). Les résultats sur les différents SDHi et espèces ne permettent pas de conclure définitivement à une action des SDHi sur la respiration cellulaire chez les organismes non-cibles à des concentrations représentatives de l'exposition environnementale à ces fongicides. D'autres études, réalisées avec des contrôles expérimentaux rigoureux sur des échantillons de nature homogène (par exemple des préparations de mitochondries isolées) et incluant des contrôles sur la qualité des préparations, sont nécessaires pour lever les incertitudes et mieux caractériser ces effets. En particulier, la détermination d'IC₅₀ *in vitro* sur des extraits cellulaires devrait être complétée par des mesures de la respiration cellulaire après une exposition aux SDHi sur cellule intacte.

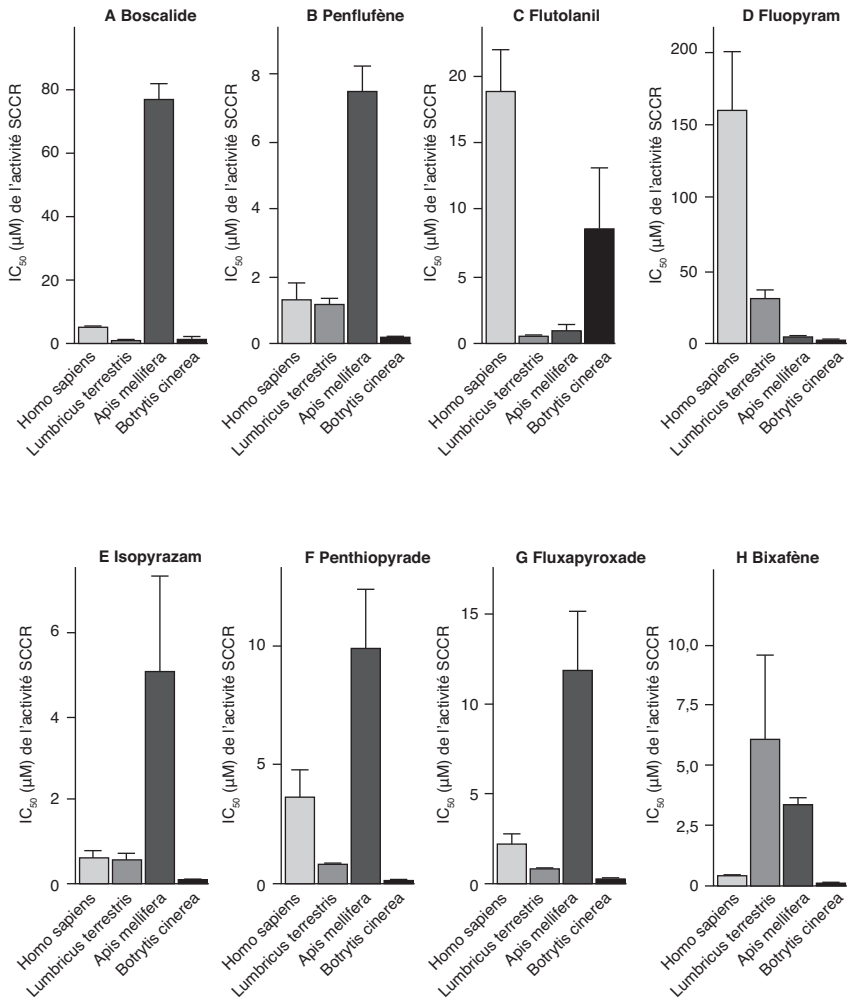


Figure 20.6 : Potentiel inhibiteur des SDHi sur la SDH mesurée sur des préparations de mitochondries de différents organismes (d'après Bénit et coll., 2019)

Les graphiques montrent les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) des substances actives testées par l'activité de la succinate-cytochrome c-réductase (SCCR).

(Figure traduite de l'anglais)

Par ailleurs, l'estimation d'un effet toxique sur les organismes (c'est-à-dire *in vivo* sur un organisme entier) devra prendre en compte les différentes caractéristiques de toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion), de toxicodynamique ou de biotransformation entre les organismes, et également des différences fines de structure de la SDH et du contexte lipidique en interaction avec les sous-unités SDHC et SDHD.

Sensibilité aux SDHi de cellules de patients présentant un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire

Dans les fibroblastes de patients présentant une altération de la chaîne respiratoire liée ou non à un déficit d'origine génétique en SDH (un patient avec un syndrome de Leigh porteur d'une mutation homozygote du gène SDHA, un patient avec une ataxie de Friedreich et un patient avec une maladie d'Alzheimer familiale), il a été observé une sensibilité accrue au bixafène et au fluxapyroxade par rapport à des fibroblastes de sujets contrôles, avec une augmentation significative du stress oxydant et de la mort cellulaire (Bénit et coll., 2019). Les auteurs de cette étude, à partir de ces données limitées soulèvent l'hypothèse que les personnes atteintes d'un dysfonctionnement mitochondrial, en particulier touchant la chaîne respiratoire, pourraient présenter une susceptibilité accrue aux éventuels effets toxiques des SDHi.

Génotoxicité et cancérogénicité

La plupart des données disponibles sur les effets cancérogènes des SDHi proviennent des dossiers techniques soumis par les firmes au moment de la demande d'autorisation de mise sur le marché européen des substances actives.

Les tests effectués incluent des essais de génotoxicité et de mutagenèse *in vitro* (sur cellules bactériennes et cellules de mammifères en culture) et *in vivo* (sur des cellules somatiques et germinales de mammifères prélevées sur des animaux exposés), ainsi que des tests de cancérogénicité sur des modèles animaux (généralement rongeurs). Ces premiers tests concluent pour la majorité des SDHi à une absence de génotoxicité (tableau 20.V). Une étude provenant d'une équipe de recherche académique s'intéressant à l'effet du bénodanil sur des lymphocytes humains rapporte un résultat négatif pour l'essai du micronoyau qui évalue un effet de cassure ou d'anomalie de répartition des chromosomes entre les cellules filles (effet clastogène ou aneugène, respectivement) (Akyil et coll., 2016).

En ce qui concerne l'évaluation réglementaire de la cancérogénicité au niveau européen, les tests sont réalisés *in vivo* après une administration répétée pendant 2 ans chez le rat et 18 mois à 2 ans chez la souris suivant la ligne directrice OCDE TG 451 ou une combinaison entre cancérogenèse (2 ans) et test de toxicité chronique (TG 453). Les données publiées par l'Efsa et l'Echa montrent que la plupart des SDHi augmentent l'incidence des adénomes et des carcinomes dans différents organes, principalement le

foie mais aussi la thyroïde, le poumon et l'utérus (tableau 20.V), avec pour certains un dimorphisme sexuel puisque les atteintes ne sont pas les mêmes chez les animaux mâles et les femelles (tumeurs hépatiques et thyroïdiennes, astrocytomes).

Tableau 20.V : Génotoxicité, cancérogénicité et classification cancérogène des fongicides SDHi autorisés au niveau européen (d'après Anses, 2019 ; rapports Efsa, site de l'Echa¹)

Substance active	Génotoxicité	Cancérogénicité	Proposition de classification Efsa	Classification Echa
Benzovindiflupyr	Non	Tumeurs thyroïdiennes (rat)	Non classé	Non classé
Bixafène	Non	Non	Non classé	Non classé
Boscalide	Non	Non	Non classé	Non classé
Carboxine	Oui <i>in vitro</i> Non <i>in vivo</i>	Hépatocarcinomes (rat) ; adénomes pulmonaires (souris)	Carc 3 ²	Non classé
Fluopyram	Non	Adénomes et carcinomes hépatiques (rats femelles) ; adénomes folliculaires de la thyroïde (souris mâles)	Carc 3 ³	Non classé
Flutolanil	Non	Non	Non classé	Non classé En cours
Fluxapyroxad	Non	Tumeurs hépatiques (rat) ; adénomes folliculaires de la thyroïde (rats mâles)	Carc 2	Non classé
Isofétamide	Non	Non	Non classé	Non classé
Isopyrazam	Non	Adénomes hépatocellulaires (rat) et adénocarcinomes utérins (rat)	Carc 2	En cours
Penflufène	Non	Adénome hépatique (rats mâles) ; carcinome hépatique (rat) ; adénomes ovariens (rat) ; astrocytomes (rats mâles) ; sarcomes histiocytaires (rats mâles)	Carc 2	Carc 2
Penthiopyrade	Non	Adénomes folliculaires de la thyroïde (rats mâles) ; adénomes hépatiques et hépatocarcinomes (souris mâles)	Carc 2	Non classé
Sédaxane	Non	Adénomes hépatiques et thyroïdiens (rats mâles), adénocarcinomes utérins (rat) ; adénomes hépatiques (souris mâles)	Carc 2	Carc 2

Classification harmonisée (Règlement CE n° 1272/2008) Carc 2 : « susceptible de provoquer le cancer » ; Carc 3 : « effet cancérogène suspecté, preuves insuffisantes ». Le cyflumétofène, un insecticide SDHi autorisé au niveau européen, est classé par Echa comme non génotoxique et fait l'objet d'une classification Carc 2.

¹ <https://www.echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals> [consulté le 1^{er} avril 2020].

² Source : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1857> [consulté le 27 août 2020]. À noter que la classification Efsa indiquée dans l'avis de l'Anses est « Carc 2 » (Anses, 2019).

³ Source : <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3052> [consulté le 27 août 2020]. À noter que la classification Efsa indiquée dans l'avis de l'Anses est « Carc 2 » (Anses, 2019).

Ces observations ont conduit l'Efsa à proposer le classement de certains SDHi comme cancérogènes de catégorie 2 mais ces propositions n'ont pas toujours été retenues par l'Echa. Sur la base de publications scientifiques réalisées par les firmes (Rouquié et coll., 2014 ; Tinwell et coll., 2014 ; Peffer et coll., 2018 ; Plummer et coll., 2018) ou d'études non publiées mais référencées en interne lors de l'évaluation réglementaire, le mécanisme d'action rapporté pour rendre compte des effets cancérigènes des SDHi évoque l'activation du récepteur nucléaire CAR (*constitutive androstane receptor*). Principalement considéré comme un récepteur de xénobiotiques (par exemple des pesticides et des médicaments) très exprimé dans le foie et l'intestin, mais se liant également à des molécules endogènes, l'activation de CAR déclenche la régulation transcriptionnelle d'enzymes (de la famille des cytochromes, des uridine diphospho glucuronyltransférases...) et de transporteurs intervenant dans la métabolisation et l'élimination de substances exogènes et endogènes. Son activation dans les hépatocytes de souris ou de rats stimule la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire, favorisant ainsi le développement de lésions préneoplasiques focales (nodules hyperplasiques) qui peuvent conduire à des tumeurs du foie bénignes (adénomes) ou malignes (carcinomes). Toutefois, ce mécanisme est considéré comme spécifique aux rongeurs car de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'activation de CAR dans les cellules humaines n'induit pas la synthèse de l'ADN, comme il a été largement documenté pour l'hépatocarcinogénèse différentielle du phénobarbital entre le rat et l'être humain (Elcombe et coll., 2014). La problématique de la pertinence de ce mécanisme d'action pour l'être humain, et donc plus généralement du recours à des modèles de rongeurs dans le cadre de l'évaluation du potentiel cancérigène des substances chimiques fait encore l'objet de débat (Felter et coll., 2018). Par ailleurs, les études de cancérogénicité réalisées révèlent aussi l'apparition de tumeurs dans des tissus exprimant peu ce récepteur (thyroïde, utérus, ovaire...).

Toutefois, un mécanisme d'action impliquant CAR est également évoqué pour expliquer la survenue des tumeurs de la thyroïde chez les rongeurs observées en lien avec l'exposition à certains SDHi, notamment le sédaxane (Rouquié et coll., 2014), le fluopyram, le fluxapyroxade et le penthiopyrade sur la base d'un mécanisme reliant le métabolisme hépatique et la fonction thyroïdienne¹¹⁴. L'activation de CAR induit en effet l'expression hépatique de l'enzyme UGT1A1 (*UDP-glucurunosyltransférase 1 polypeptide A1*) qui

114. Sources : documents de l'Echa CLH-O-0000001412-86-46/F (<https://echa.europa.eu/documents/10162/27e65bc5-6daf-118a-1f47-09fc774b6538>), CLH-O-0000001412-86-254/F (<https://echa.europa.eu/documents/10162/f21ff9a9-fbec-7faf-bc9e-c126f329599f>), et CLH-O-0000001412-86-78/F (<https://echa.europa.eu/documents/10162/2095a6a7-e83b-1d9a-4d46-6b537c4739a7>) [consulté le 14 septembre 2020].

intervient dans la clairance des hormones thyroïdiennes (HT) en stimulant la conjugaison et l'élimination biliaire de la thyroxine. Ce mécanisme de clairance exerce un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien lequel conduit à une production compensatrice de TSH (*thyroxin stimulating hormone*). La TSH, en stimulant la thyroïde, participe à un processus d'hyperplasie qui, dans le cas d'une activation chronique, peut conduire à une tumeur. Ce mécanisme n'est pas transposable à la régulation du taux d'HT chez l'être humain qui exprime la *thyroxine binding globulin* (TBG) sérique, absente chez le rat, avec pour conséquence une demi-vie des HT plus courte chez le rat. De plus, la glande thyroïde stocke une quantité de thyroglobuline bien plus élevée chez l'être humain ce qui limite le recours à un état d'hyperplasie compensatrice (Hurley, 1998). Le cas particulier de l'association entre l'exposition à ces SDHi et la survenue de cancer de la thyroïde chez les rongeurs n'a pas été jugé pertinent pour l'être humain par les agences réglementaires, selon la mise en application du principe de déclassification « *mode of action* » en se référant aux critères établis par le WHO/IPCS (*World Health Organization/International Programme on Chemical Safety*) (Boobis et coll., 2006 ; Meek et coll., 2014).

Effets sur le développement et le système endocrinien

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un modèle expérimental intéressant pour étudier les mécanismes par lesquels les facteurs de stress externes, dont les contaminants, sont susceptibles de perturber les fonctions biologiques chez les vertébrés. Ils présentent de nombreux avantages (leur facilité de manipulation, rapidité de l'embryogénèse, cycle de vie court...), qui ont conduit à leur utilisation répandue en toxicologie. Une vingtaine d'études portant sur la toxicité des SDHi chez les poissons zèbres ont été identifiées. Ces études, menées essentiellement par des groupes de chercheurs chinois, ont été réalisées sur les embryons et larves sur des temps courts d'exposition (la majorité sur 96 h), ou sur les poissons adultes dans des conditions d'exposition chronique (généralement 28 ou 60 jours).

Toutes les substances testées sur les embryons (bixafène, boscalide, flutolanil, fluxapyroxade, isopyrazam, penthiopyrade, sédaxane, et thifluzamide) ont des effets toxiques et induisent des malformations et des anomalies de développement (œdème péricardique, scoliose, pigmentation, développement cérébral anormal) et de comportement. Ces effets sont associés, dans plusieurs de ces études, à des anomalies structurelles et fonctionnelles des mitochondries, à l'induction d'un stress oxydant et à une induction de l'apoptose et des altérations du métabolisme des lipides (Yang et coll., 2016b ; Yang et

coll., 2016a ; Qian et coll., 2018a ; Teng et coll., 2018 ; Yao et coll., 2018b ; Yao et coll., 2018a ; Qian et coll., 2019a ; Yang et coll., 2019c ; Yang et coll., 2019b ; Li et coll., 2020a ; Li et coll., 2020b ; Wang et coll., 2020). À ces études s'ajoute une étude française récente qui montre que l'exposition des embryons au bixafène à des concentrations $\geq 0,2 \mu\text{M}$ ($\geq 0,083 \text{ mg/l}$) provoque des anomalies du développement cérébral et une inhibition de la croissance des motoneurones spinaux (Brenet et coll., 2020).

Deux SDHi semblent aussi avoir des effets de perturbation endocrinienne chez les embryons : le thifluzamide qui conduit à une diminution de l'hormone de croissance dans des extraits d'embryons entiers à des concentrations $\geq 0,19 \text{ mg/l}$ (Yang et coll., 2019b), et le flutolanil qui augmente la production des hormones thyroïdiennes tri-iodothyronine et thyroxine, et perturbe l'expression de plusieurs gènes intervenant dans la fonction thyroïdienne (*TRH*, *TSHR*, *TPO*, *Dio1*, *TR α* , et *UGT1ab*) à des concentrations $\geq 0,5 \text{ mg/l}$ (Teng et coll., 2018). Ces deux SDHi augmentent également l'expression de la mélatonine et perturbent le cycle circadien (Yang et coll., 2019c ; Yang et coll., 2019b).

Tous les SDHi testés sur les poissons adultes ont un effet hépatotoxique avec des lésions (dégénérescence graisseuse et vacuolisation des hépatocytes) observées à partir de 21 jours d'exposition à $0,19 \text{ mg/l}$ de thifluzamide (Yang et coll., 2016b ; Yang et coll., 2017 ; Yang et coll., 2018a ; Yang et coll., 2018b), après 28 jours d'exposition à $0,1 \text{ mg/l}$ de boscalide (Qian et coll., 2019b) et après 60 jours d'exposition à $0,05 \text{ mg/l}$ de flutolanil (Teng et coll., 2019). Une induction d'un stress oxydant et de l'apoptose et une altération du métabolisme des glucides et des lipides ont également été mises en évidence dans ces conditions expérimentales. Plus récemment, Qian et coll. ont montré que les poissons zèbres adultes exposés à 1 mg/l de boscalide pendant 21 jours présentent des anomalies histopathologiques de la rétine et du cerveau, ainsi qu'une diminution de la locomotion et de la capacité de prédation (Qian et coll., 2021). En outre, cette étude a mis en évidence des effets neurotoxiques chez les larves à partir de 4 jours d'exposition à $1,2 \text{ mg/l}$ de boscalide.

Enfin, certains SDHi semblent avoir des effets de perturbation endocrinienne chez les poissons adultes. C'est le cas pour le thifluzamide qui stimule l'expression de l'hormone de croissance dans le foie et inhibe la sécrétion de la leptine (Yang et coll., 2019a). Le flutolanil, quant à lui, a un effet œstrogénique. Les poissons mâles exposés au flutolanil à des concentrations faibles ($\geq 0,25 \mu\text{g/l}$) pendant 60 jours montrent une augmentation de la concentration plasmatique de 17β -estradiol et une diminution de celle de testostérone (Teng et coll., 2020). L'exposition des poissons femelles au flutolanil

conduit à une augmentation de la concentration plasmatique de 17β -estradiol et une perturbation du profil de méthylation génomique dans l'ovaire. Ces modifications ont pour conséquence des effets néfastes sur la reproduction. Les embryons issus des croisements des animaux exposés sont plus petits et ont un taux de mortalité plus élevé. Plus récemment, ce même groupe a montré que l'exposition pendant 21 jours à 1 mg/l de boscalide est associée à un effet oestrogénique chez les poissons mâles et que, contrairement au flutolanil, il possède une activité anti-oestrogénique chez les femelles (diminution du taux plasmatique de 17β -estradiol et perturbation de la fertilité) à des concentrations $\geq 0,01$ mg/l (Qian et coll., 2020).

Ces effets toxiques semblent donc indiquer que les SDHi perturbent le développement, le métabolisme et certaines fonctions hormonales, et suggèrent que ces fongicides pourraient être considérés, au moins chez les poissons, comme des perturbateurs endocriniens. Cependant, il est à noter que les résultats *in vivo* suggérant une perturbation endocrinienne proviennent seulement de deux groupes et doivent être confirmés. Des données dans d'autres espèces et modèles expérimentaux n'ont pas été identifiées, sauf pour le boscalide qui inhibe l'expression de la prostaglandine D2 dans une lignée de cellules de souris (Kugathas et coll., 2016). Il est à noter que les rapports d'évaluation des risques de l'Efsa rapportent des effets perturbateurs endocriniens potentiels chez les rats pour le benzovindiflupyr (effets sur la reproduction), et pour le fluopyram et le penflufène, des lacunes dans les données n'ont pas permis à l'agence de conclure définitivement à l'absence d'effets perturbateurs endocriniens (Efsa, 2013 ; Efsa, 2015 ; Efsa, 2016).

Données d'écotoxicologie

Il existe un certain nombre d'études d'écotoxicologie démontrant des effets délétères de l'exposition aux SDHi sur les écosystèmes et la biodiversité¹¹⁵. Outre le fait que les effets mis en évidence peuvent avoir des éventuelles répercussions sur la santé humaine, ces travaux sont importants pour mieux comprendre les processus biologiques qui pourraient être altérés par les SDHi.

SDHi et abeilles

Les abeilles mellifères peuvent être exposées aux pesticides pendant de longues périodes, à travers l'eau contaminée, le pollen et le nectar. Certaines

115. L'analyse des données d'écotoxicologie dépasse le cadre de cette expertise et la composition du groupe d'experts, ciblant les effets sanitaires, n'est pas adaptée pour en faire une analyse exhaustive. Cependant, il est apparu fondamental de mentionner et d'explorer cet aspect qui pourrait faire l'objet d'une expertise multidisciplinaire plus complète.

plantes affichées comme favorisant les pollinisateurs se retrouvent contaminées par des pesticides dont des SDHi comme le boscalide ; une étude de 2017 utilisant la spectrométrie de masse, a détecté le boscalide dans les feuilles de 14 sur 29 espèces ou variétés de plantes mellifères à une concentration moyenne de 37 ng/g (Lentola et coll., 2017). Dans une étude conduite dans la région Rhône-Alpes, le boscalide est l'un des pesticides les plus détectés chez les abeilles, à des fréquences au moins aussi élevées que les néonicotinoïdes (14 %), et à des concentrations de 1 à 47,6 ng de boscalide/g de poids corporel (Daniele et coll., 2018). La cire ainsi que le pain d'abeille (nourriture des larves) sont également fréquemment contaminés par le boscalide par rapport à d'autres pesticides, avec des niveaux dans le pain d'abeille pouvant atteindre plus de 700 ng/g de pain (Daniele et coll., 2018). Dans la cire, le boscalide est détecté dans 39 % des échantillons avec des concentrations supérieures à 300 ng de boscalide/g de cire (Daniele et coll., 2018).

Dans une autre étude, concernant cette fois la région de l'East Sussex au Royaume-Uni, David et coll. ont décrit la présence de résidus de boscalide dans le pollen de colza (jusqu'à 25 ng/g) et le pollen de fleurs de bords de champs (jusqu'à 38 ng/g) (David et coll., 2016). Ces travaux mettent également en évidence que les abeilles qui collectent ce pollen rapportent les résidus à la ruche (jusqu'à 21 ng/g), bien que les quantités de boscalide détectées dans les abeilles soient moindres, de 0,24 à 9,8 ng/g de poids corporel (David et coll., 2016). Ces variations soulignent les différences de contamination des abeilles en fonction des régions et donc des cultures et traitements des parcelles. Dans une étude subséquente menée dans la même région, ces auteurs ont montré également une haute fréquence de détection du boscalide dans 35 % des bourdons sauvages, à des concentrations allant jusqu'à 54,5 ng/g et une variabilité de la contamination en fonction des espèces de bourdons et en fonction de la saison (Botias et coll., 2017). Il est à noter que bien que le niveau de contamination soit globalement plus élevé dans les zones arables (jusqu'à 31,7 ng/g de poids corporel), le boscalide est aussi détecté dans des bourdons collectés en zone urbaine (jusqu'à 54 ng/g de poids corporel). Enfin, une exposition de larves à la Pristine (une formulation contenant du boscalide) affecte leur survie à l'âge adulte, avec un effet significativement potentialisé en mélange avec d'autres résidus d'insecticides à faible dose (Wade et coll., 2019).

Un test de toxicité chronique des produits chimiques chez l'abeille est défini dans les lignes directrices de l'OCDE. Ce test (OCDE essai n° 245), utilisé pour générer des données à des fins réglementaires, implique l'exposition des ouvrières adultes à une substance chimique (par exemple un pesticide) par voie orale pendant une période de 10 jours au cours de laquelle la mortalité

et les anomalies de comportement sont mesurées quotidiennement. En 2018, Simon-Delso et coll. ont montré que la mortalité des abeilles exposées au boscalide est faible avant 10 jours d'exposition (Simon-Delso et coll., 2018). Le temps léthal 50 % (TL₅₀ ; temps d'exposition pour lequel la mortalité de la population d'abeilles est de 50 % à une concentration de substance active donnée) est de 25 jours pour la concentration de boscalide la plus faible testée (1,125 mg/l). De plus, la concentration létale 50 % (CL₅₀ ; concentration de substance active pour laquelle 50 % de la population d'abeilles est morte après une période d'exposition donnée) est dix fois plus élevée à 8 jours qu'à 25 jours (respectivement 14,7 et 1,17 mg/l). Ces observations, qui méritent d'être reproduites, soulignent le fait que les approches « exposition jusqu'à la mort » sont plus pertinentes que les approches « exposition à durée fixe », en particulier pour les doses d'exposition faibles (Simon-Delso et coll., 2018).

L'exposition des abeilles au boscalide peut également altérer certaines fonctions physiologiques. Ainsi, il a été démontré que des abeilles nourries avec du pollen dont les cultures ont été traitées à la Pristine digéraient moins le pollen et présentaient une plus forte charge virale, et une baisse des concentrations en ATP, évoquant une dérégulation métabolique possiblement liée à une malnutrition (DeGrandi-Hoffman et coll., 2015 ; Campbell et coll., 2016). Il est important de noter que de tels symptômes rendent les abeilles vulnérables à d'autres stress environnementaux, comme les parasites (*Nosema ceranae*) et les pathogènes. Ainsi, associé à *N. ceranae*, le boscalide impacte la composition du microbiote intestinal des abeilles (alpha-protéobactéries et gamma-protéobactéries) dont l'importance dans la régulation de la fonction du système nerveux est de plus en plus soulignée (Paris et coll., 2020). À titre d'exemple, une étude récente démontre que le boscalide réduit la fréquence de battement d'ailes des butineuses pendant le vol, sans modifier toutefois la durée du vol, ainsi que l'efficacité des butineuses au niveau de la colonie (Liao et coll., 2019). De plus, la Pristine modifie le comportement relatif à la reconnaissance du nid chez les abeilles solitaires (Artz et Pitts-Singer, 2015).

SDHi et écosystèmes aquatiques

Les effets délétères des pesticides sur les organismes aquatiques et plus particulièrement les poissons, sont aujourd'hui de plus en plus documentés (Bony et coll., 2008 ; Gandar et coll., 2017). En plus de constituer un modèle de choix pour les études de toxicologie (voir ci-dessus), les poissons sont des indicateurs sensibles de la qualité des écosystèmes aquatiques.

Chez l'amphibien *Xenopus tropicalis*, l'exposition au bixafène ou à l'isopyrazam à des concentrations ≥ 1 mg/l conduit à des effets tératogènes avec des microcéphalies, des défauts de mise en place des somites et des hypopigmentations (Wu et coll., 2018). De nombreux fongicides SDHi sont commercialisés sous forme de formulations contenant, outre la ou les substances actives, d'autres composés (tensioactifs, solvants, stabilisants, anti-moussants, conservateurs...) qui peuvent posséder leur propre toxicité et/ou interférer avec les substances actives. Ces formulations peuvent contenir plus d'une substance active SDHi, ou un SDHi avec un fongicide de la famille des triazoles qui inhibe la synthèse des stérols. D'autres contiennent des fongicides de la famille des strobilurines (pyraclostrobine, dimoxystrobine, fluoxastrobine, krésoxime-méthyle) qui inhibent la respiration cellulaire en agissant sur le complexe III de la chaîne respiratoire et qui pourraient donc potentialiser les effets des SDHi sur la fonction mitochondriale. En effet, l'exposition des embryons de xénope à un mélange de deux SDHi (bixafène et l'isopyrazam) ou d'un SDHi et une strobilurine entraîne des effets toxiques synergiques (Wu et coll., 2018). Cela souligne l'importance de tester non seulement les substances actives mais aussi les formulations dans des études de toxicologie.

Parmi les espèces aquatiques, on peut également citer les micro-algues comme *Chlorella vulgaris* dont la photosynthèse et la croissance sont altérées par la présence du boscalide dans l'eau (1,6 mg/l) (Qian et coll., 2018b).

Enfin, les fongicides pourraient également avoir un effet négatif sur les écosystèmes d'eau douce en altérant la décomposition des feuilles mortes réalisée par des champignons aquatiques (présents dans les ruisseaux par exemple), ce qui réduirait la formation d'un substrat nutritif essentiel pour la flore microbienne et les amphipodes (crustacés). En effet, Elskus et coll. ont montré que la Pristine (contenant le boscalide) entraîne une baisse de la croissance microbienne et par conséquent de la biomasse des amphipodes (Elskus et coll., 2016).

SDHi et écosystèmes du sol

Certains SDHi sont vendus pour leurs propriétés nématicides, par exemple sous la formulation *Indemnify*, utilisé pour les gazons, terrains de football ou de golf. Le fluopyram qu'il contient affecte la viabilité des nématodes ainsi que leur comportement d'attraction pour les racines (Oka et Saroya, 2019). Mais, ils présentent aussi l'inconvénient de détruire de nombreux organismes vivants utiles. En effet, les travaux récemment publiés par Bénit et coll. montrent que les principaux SDHi bloquent la SDH du ver de terre (Bénit et coll., 2019). Le fluopyram et la carboxine sont fortement toxiques pour

le ver de terre *Eisenia andrei*, avec un blocage des mécanismes de détoxication qui concourt à la rétention de ces pesticides dans les organismes (Velki et coll., 2019). Le thifluzamide inhibe la croissance et la reproduction des vers à des doses de 10 mg/kg de sol après 28 jours. Cela est associé à un blocage de la SDH dès 1 mg/kg de sol (Yao et coll., 2020). Des études sur le polychète estuarien *Simplisetia aequisetis* en Australie montrent que des doses sub-létales de boscalide modifient précocement (48 h) le métabolome du ver, avec une forte altération du cycle de Krebs, et des voies de détoxication impliquées dans la synthèse de glutathion, probablement mobilisées pour éliminer le boscalide. Cela se traduit ensuite au niveau physiologique par une baisse de réserves énergétiques lipidiques et une augmentation de la mortalité après 336 h d'exposition (Sinclair et coll., 2019). Par ailleurs, la carboxine associée au thirame, un fongicide non-SDHi, à des doses supérieures à 50 mg/kg de sol inhibe la reproduction et modifie le comportement d'évitement du ver *E. andrei* (Alves et coll., 2013).

Données épidémiologiques : exposition aux SDHi et survenue de pathologies

Dans le cadre de cette expertise, une recherche bibliographique détaillée a été menée afin d'identifier des études épidémiologiques ayant porté sur les effets de ces fongicides sur la santé humaine. À défaut d'une connaissance structurée, suivie et contrôlée des usages réels de pesticides en France ainsi que dans d'autres régions du monde, il est difficile d'analyser à travers des études épidémiologiques le rôle d'une substance active spécifique dans la survenue d'une maladie. La reconstitution rétrospective des expositions est rendue complexe par la multiplicité des produits utilisés par les professionnels, par la fréquence des associations de produits au cours d'une journée, d'une saison et encore plus d'une vie, par la variation de leurs usages selon les cultures, les périodes, et les zones géographiques, par la fréquente méconnaissance des travailleurs vis-à-vis des substances auxquelles ils ont été exposés et la difficulté à fournir a posteriori des calendriers de traitement. Or, pour les effets chroniques tels que des cancers ou des pathologies dégénératives, une latence d'une à plusieurs décennies doit être prise en compte dans l'évaluation. Concernant les fongicides SDHi, environ la moitié des matières actives a été introduite sur le marché après 2010, ce qui ne permet pas à ce jour de disposer d'un recul suffisant pour l'étude d'effets chroniques possibles. Une seule molécule de cette famille est actuellement sur le marché français depuis plus de 50 ans, la carboxine, une autre depuis plus de 25 ans, le flutolanil, et une dernière depuis 14 ans, le boscalide. Les autorisations

des produits contenant la carboxine ont été retirées fin 2018 en France, alors que le flutolanil et le boscalide sont toujours autorisés. Il est notable que deux de ces molécules (carboxine et flutolanil) l'étaient dans des usages spécifiques : la carboxine pour le traitement de semences de céréales, et le flutolanil pour le traitement des tubercules de pommes de terre. Le boscalide pour sa part est utilisé en application sur diverses cultures (vignes, céréales, colza, légumes...).

Dans le cadre de cette expertise, plusieurs algorithmes de recherche bibliographique ont été construits pour identifier des études épidémiologiques portant sur les effets sanitaires possibles de ces molécules (voir addenda en fin de chapitre : paragraphe « Algorithmes de recherche bibliographique »). En premier lieu les noms des matières actives ont été introduits dans des algorithmes en les conjuguant avec des termes relatifs aux études épidémiologiques. De la même manière, le mécanisme « inhibition de la succinate déshydrogénase » a été associé aux termes relatifs aux études épidémiologiques. Les noms des familles chimiques (carboxamides et benzamides) de ces molécules ont également été utilisés, en ajoutant des termes relatifs aux usages (pesticides, fongicides, insecticides, acaricides, herbicides). Enfin, compte tenu des usages spécifiques de certaines de ces substances, des algorithmes ont inclus des termes relatifs au traitement de semences ou à la culture de pommes de terre.

L'ensemble de ces recherches n'a pas permis d'identifier d'étude épidémiologique ayant analysé de manière spécifique le lien entre l'exposition à un fongicide SDHi et un évènement de santé, à l'exception de celle publiée par Béranger et coll. (2020). Cette étude réalisée au sein de la cohorte ELFE en France a révélé la présence de boscalide dans les cheveux des mères (195 échantillons positifs pour la présence de boscalide sur 311 échantillons de cheveux de mères testés) mais n'a pas montré d'association entre l'exposition maternelle au boscalide (estimée par la mesure de sa concentration dans les cheveux, médiane des concentrations mesurées de 0,55 pg/mg de cheveu) et les paramètres anthropométriques des enfants à la naissance (poids, taille et périmètre crânien), suggérant l'absence d'association de l'exposition au boscalide pendant la grossesse sur la croissance intra-utérine.

Nous avons également examiné les articles renseignant de façon indirecte les expositions professionnelles aux substances actives les plus anciennement mises sur le marché, notamment à travers des activités liées aux traitements des tubercules de pommes de terre ou cultures de pommes de terre (flutolanil), de cultures variées (boscalide), ou aux traitements de semences (carboxine par exemple).

Exposition potentielle au flutolanil lors de la culture de pommes de terre

Il n'a pas été identifié d'étude portant sur la santé des personnes réalisant le traitement des tubercules de pommes de terre, potentiellement exposées au flutolanil. De manière plus large, peu d'études ont exploré spécifiquement la santé des cultivateurs de pommes de terre, dont certains auraient pu réaliser ces traitements et/ou être au contact de la substance par manipulation de tubercules traités. Au sein de la cohorte AGRICAN, des analyses ont été menées selon le type de cultures produites par les agriculteurs pour les cancers de la prostate, du poumon, de la vessie, du cerveau, les lymphomes malins non hodgkiniens et les myélomes multiples, et pour les sarcomes des tissus mous. Pour le cancer de la prostate, une élévation de risque était observée chez les cultivateurs de pommes de terre qui avaient été exposés aux pesticides (OR = 1,21 ; IC 95 % [1,02-1,44]) (Lemarchand et coll., 2016). De même, pour les tumeurs cérébrales, les cultivateurs de pommes de terre présentaient une élévation de risque, plus marquée chez ceux qui utilisaient des pesticides (HR = 2,11 ; IC 95 % [1,19-3,75]) et ceux qui traitaient les semences/plants (HR = 2,84 ; IC 95 % [1,34-6,03]) (Piel et coll., 2017). Cependant, il n'a pas été mené d'analyse spécifiquement sur le flutolanil, et diverses autres molécules ont été utilisées pour ces traitements.

Exposition potentielle au boscalide

Compte tenu de l'autorisation du boscalide sur des cultures variées et très répandues en France (vigne, colza, pois et haricots, betterave sucrière et fourragère, céréales...), et du fait de son usage classique en tant que traitement des parties aériennes des cultures, il n'apparaît pas simple d'identifier des groupes d'agriculteurs ou des tâches spécifiques permettant de cibler les effets possibles de cette substance. Le lien entre cette substance et la survenue de maladies chroniques comme les pathologies cancéreuses ou les maladies neurodégénératives n'a pas été étudié à ce jour dans AGRICAN. Seuls les suivis de la cohorte pourront réellement être informatifs car la molécule a été mise sur le marché en France au moment de l'inclusion dans la cohorte (2005). Dans la cohorte américaine *Agricultural Health Study*, la molécule n'a pas non plus été spécifiquement étudiée à ce jour car elle ne faisait pas partie des 50 molécules intégrées au questionnaire d'inclusion dans la cohorte. On ne dispose donc à ce jour d'aucune étude ayant porté sur les effets spécifiques possibles du boscalide sur la santé des agriculteurs, ni même d'indicateurs indirects qui permettraient d'approcher l'exposition à cette substance.

Exposition potentielle à la carboxine par le traitement de semences

Pour les traitements de semences, qui ont pu être réalisés avec la carboxine à partir de 1968, il n'a pas été identifié d'étude portant spécifiquement sur la santé des personnes exposées à cette substance. Il est à noter que le traitement de semences par la carboxine a été autorisé pour un nombre assez important de cultures, en particulier pour diverses céréales mais aussi le maïs, le soja et les pois. Cependant, de nombreuses autres substances ont été utilisées pour le traitement des semences, et la carboxine elle-même n'était plus utilisée seule dès les années 1970. Elle était toujours associée à d'autres molécules entrant dans la composition des produits de traitement de semences comme le cuivre, le lindane, l'anthraquinone, le thirame, le captane... Ces différents éléments rendent complexes l'étude des effets potentiels spécifiques de la carboxine dans les populations humaines, même à partir d'indicateurs indirects. De manière plus large, alors que de nombreuses études ont porté sur l'impact des traitements de semences (comme les néonicotinoïdes) sur les insectes pollinisateurs, il n'existe que peu d'études sur la santé des agriculteurs réalisant eux-mêmes le traitement de leurs semences ou manipulant des semences traitées avant leur achat. Dans la cohorte AGRICAN, la réalisation de traitements de semences faisait l'objet de questions auprès des participants dans le questionnaire d'inclusion. Une élévation modérée du risque a été observée entre le traitement des semences de céréales et le cancer de la prostate (HR = 1,16 ; IC 95 % [1,01-1,34]) (Lemarchand et coll., 2016). Une augmentation de risque, non statistiquement significative, a également été retrouvée pour le traitement des semences et le cancer de la vessie (HR = 1,24 ; IC 95 % [0,77-1,99]) (Boulanger et coll., 2017). Il n'est pas possible de déterminer le rôle spécifique de la carboxine dans ces élévations de risque.

Conclusion

Les SDHi constituent une famille de fongicides, dont certains, comme la carboxine et le flutolanil sont utilisés depuis plus de trente ans, et d'autres, tels que ceux de seconde génération, depuis une dizaine d'années (boscalide, benzovindiflupyr, isopyrazam, penthiopyrade, sédaxane...). Alors que l'utilisation de la première génération de ces pesticides en France a diminué ces dix dernières années, celle des SDHi de nouvelle génération est en hausse et s'élargit à d'autres spectres d'activité (par exemple pour le traitement contre les nématodes sur les gazons).

La population française est potentiellement exposée aux SDHi par l'air, l'alimentation, l'eau, et le sol (utilisation sur les pelouses de stades ou de golfs),

ou en milieu professionnel lors de la manipulation et l'épandage des produits. En France, les programmes de surveillance dans les différents milieux s'intéressent à plusieurs SDHi, notamment le boscalide (le plus vendu) qui est surveillé et détecté dans le compartiment aérien et les systèmes aquatiques. Le boscalide, avec le flutolanil et la carboxine ont été inclus dans les études françaises de l'alimentation totale (EAT) qui visent à évaluer le risque pour la santé du consommateur et ils font l'objet (avec le bixafène, le fluopyram, le fluxapyroxade, le penthiopyrade et le benzovindiflupyr) d'une surveillance dans les denrées alimentaires. Au niveau européen, les fongicides SDHi ont été quantifiés dans 2,2 % de plus de 500 000 analyses des échantillons d'aliments réalisées en 2018. Parmi seize SDHi mesurés, le fluopyram et le boscalide étaient, de loin, les plus souvent quantifiés et le boscalide a dépassé la limite maximale en résidus dans 0,08 % des échantillons testés. Les SDHi ne figurent pas dans les programmes existants de surveillance biologique humaine en France ; par conséquent, il existe très peu de données sur l'imprégnation de la population générale par ces substances. En France, une seule étude académique, portant sur 311 femmes enceintes de la cohorte ELFE, a quantifié le boscalide avec une fréquence de détection de 63 % dans les cheveux. Aucune étude n'a été retrouvée permettant d'évaluer l'exposition des professionnels aux SDHi.

Le mécanisme d'action des fongicides SDHi est basé sur la perturbation du fonctionnement mitochondrial par l'inhibition de l'activité SDH, un complexe enzymatique impliqué dans la respiration cellulaire (complexe II) et donc essentiel à la vie. Chez l'être humain, les conséquences d'une inactivation génétique de la SDH (mutation de l'un des quatre gènes codant les sous-unités de l'enzyme) sont bien documentées avec le développement de pathologies neurologiques et cancéreuses, notamment liées à l'accumulation du substrat de la SDH, le succinate. Un niveau élevé de cet « oncométabolite » peut entraîner des processus associés à la tumorigenèse comme une dérégulation de l'homéostasie métabolique, un stress oxydant induisant un état de « pseudo-hypoxie » cellulaire, des modifications épigénétiques, et la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse impliquée dans le processus métastatique. Si les perturbations mitochondriales d'origine génétique chez l'être humain prédisposent à de nombreuses pathologies, cela ne signifie pas *ipso facto* qu'une inhibition partielle ou totale de l'activité de la SDH, par exemple dans le cas d'une exposition chronique aux SDHi, entraînerait les mêmes effets physiopathologiques.

Néanmoins, le complexe SDH est fortement conservé entre espèces. En effet, des études de cristallographie et de génétique ont montré que la structure de la SDH est conservée d'une espèce à l'autre avec des séquences peptidiques

homologues au niveau du site catalytique. Tout ceci conduit à s'interroger légitimement sur les conséquences délétères des expositions aux SDHi sur la santé humaine et sur la biodiversité. Malgré la conservation de la structure de la SDH au cours de l'évolution, certains travaux suggèrent une variabilité importante du profil d'inhibition de son activité par différents SDHi selon les espèces. Toutefois, les résultats de ces études sont difficiles à comparer du fait de différences voire de lacunes méthodologiques. Les données actuellement disponibles sont donc insuffisantes pour conclure à une spécificité des SDHi pour la SDH des champignons et à leur innocuité pour les espèces non-cibles. Pour cela, il est nécessaire d'une part de produire *in vitro* des données d'IC₅₀ à partir d'échantillons de nature homogène et d'autre part de générer des données expérimentales *in vivo* dans des modèles animaux, prenant en compte les caractéristiques de toxicocinétique, de toxicodynamique et de biotransformation des SDHi dans les organismes entiers.

Concernant les effets toxiques potentiels des SDHi sur différentes espèces, une série d'études sur les poissons-zèbres, dont la moitié ont été publiées par le même groupe de recherche, montrent que l'exposition aux SDHi pourrait entraîner des anomalies de développement et de nombreuses malformations ainsi que des perturbations du métabolisme, de la fonction thyroïdienne, ou de la reproduction. Ces effets suggèrent que ces fongicides pourraient être considérés, au moins chez cette espèce, comme des perturbateurs endocriniens.

Quelques études ont exploré les effets des SDHi sur les écosystèmes. Elles ont montré que, chez les abeilles, l'exposition au boscalide modifie la composition du microbiote intestinal et a un impact sur le comportement. D'autres études ont mis en évidence des effets délétères sur des organismes du sol (toxicité et effets sur le comportement chez les nématodes et lombrics) et les organismes aquatiques (toxicité chez les algues et effets tératogènes chez des amphibiens). Ces études mériteraient d'être poursuivies afin de documenter les impacts des SDHi sur la biodiversité et éventuellement sur la régulation des écosystèmes et leurs répercussions sur la santé humaine.

Les données de cancérogénicité sur les SDHi, analysées ici, proviennent exclusivement des rapports des agences sanitaires européennes qui publient les conclusions des évaluations des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché élaborés par les entreprises. Selon ces conclusions, la majorité des SDHi ne présentent aucune génotoxicité. Cependant, pour la majorité des SDHi, les études chez les rongeurs montrent une augmentation de l'incidence des adénomes et des carcinomes dans différents organes : principalement le foie mais aussi la thyroïde, le poumon et l'utérus avec pour certains un dimorphisme sexuel. En dépit de ces observations, la grande

majorité des SDHi autorisés au niveau européen ne sont pas classifiés par les instances réglementaires comme des substances susceptibles ou suspectées de provoquer le cancer. Ces conclusions ont été tirées sur la base du mode d'action rapporté par des études industrielles pour rendre compte des effets cancérogènes des SDHi chez le rongeur qui implique l'activation du récepteur nucléaire CAR (*constitutive androstane receptor*). Ce mode d'action est considéré comme spécifique aux rongeurs et n'a pas été jugé pertinent pour l'être humain par les agences sanitaires. Ces problématiques concernant le mode d'action ainsi que les modèles expérimentaux utilisés font encore l'objet de débat au sein de la communauté scientifique et au sein-même des agences et il n'est pas possible d'exclure actuellement que d'autres mécanismes d'action mis en jeu dans la transformation tumorale que celui concernant le récepteur CAR soient impliqués, et pertinents pour l'être humain.

Concernant les tests réglementaires, des réflexions sont en cours au sein de l'OCDE sur l'évaluation du potentiel cancérogène des substances non reconnues comme étant génotoxiques (Jacobs et coll., 2020) telles que les SDHi. Le groupe d'experts international de l'OCDE a reconnu dans cette déclaration de consensus le besoin d'élargir l'évaluation avec des essais *in vitro/ex vivo*, selon une approche intégrative basée sur le concept des voies d'effets indésirables (*adverse outcome pathway*), qui consiste à décrire une séquence logique d'événements liés de façon causale à différents niveaux d'organisation biologique. Certains mécanismes identifiés par l'OCDE sont pertinents pour les SDHi, dont le stress oxydant et l'épigénotoxicité, alors que d'autres mécanismes d'intérêt qui n'ont pas été retenus, pourraient inclure notamment la mitotoxicité et la transition épithélio-mésenchymateuse. Les tests visant à établir le caractère cancérogène ou non d'une substance pourraient également intégrer la notion d'impact sur la progression tumorale (promotion/métastase), le processus d'initiation criblé notamment par les tests de génotoxicité et de mutagénicité n'étant pas le seul impliqué dans la cancérogenèse. Cependant, faire des recommandations précises sur l'amélioration des essais et des modèles en toxicologie réglementaire nécessiterait d'analyser l'ensemble des processus et des essais utilisés, ce qui dépasse largement le cadre de cette expertise.

Enfin, comme pour tous les pesticides, la toxicologie réglementaire évalue les substances actives et pas les formulations. Or, pour les SDHi, certaines formulations contiennent des fongicides de la famille des strobilurines qui inhibent la respiration cellulaire au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire et qui pourraient donc potentialiser les effets sur la fonction mitochondriale. Cela souligne l'importance de tester non seulement les substances actives mais aussi les formulations dans les études de toxicologie.

Concernant les effets chez l'être humain, il n'existe à ce jour pratiquement aucune donnée épidémiologique portant sur les effets possibles des substances actives SDHi sur la santé des agriculteurs ou de la population générale. La seule étude ayant examiné cette question, menée sur les participants de la cohorte ELFE, n'a pas montré d'association entre l'exposition au boscalide pendant la grossesse et la croissance intra-utérine. En utilisant une estimation indirecte de l'exposition aux SDHi, c'est-à-dire en considérant les tâches ou activités agricoles potentiellement exposantes aux SDHi, présents sur le marché depuis plusieurs décennies et compatible avec les délais d'apparition de pathologies (par exemple cancéreuses ou dégénératives), les rares données disponibles ne révèlent pas de signal laissant supposer un sur-risque spécifique dans ces populations agricoles. Très peu de données sont donc disponibles chez l'être humain pour évaluer le risque lié à l'utilisation des SDHi. Un renforcement de la biosurveillance humaine, l'exploitation de cohortes existantes (AGRICAN, ELFE...) à court terme et à plus long terme, la mise en place de nouvelles études épidémiologiques, pourraient permettre de mieux cerner les conséquences potentielles d'une exposition professionnelle ou non professionnelle aux SDHi sur la santé humaine.

Addenda

Mitochondrie et chaîne respiratoire

La mitochondrie est un organite dont la taille varie de 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large. La forme des mitochondries, leur localisation subcellulaire et leur nombre (qui peut atteindre plusieurs centaines par cellule) dépendent de la fonction et de l'activité métabolique des cellules. Les rôles de la mitochondrie sont multiples, incluant la production d'énergie sous forme d'ATP, l'homéostasie calcique, la thermogénèse, et la mort cellulaire.

L'organisation structurale de la mitochondrie est représentée dans la figure A20.1. Elle comporte deux compartiments séparés par une membrane externe et une membrane interne : la matrice et l'espace intermembranaire. La membrane interne forme des invaginations qui apparaissent sous forme de crêtes ou replis qui augmentent la surface de la membrane et dont le nombre varie selon l'activité mitochondriale (respiration cellulaire, oxydation des acides gras...). Les complexes de la chaîne respiratoire sont situés au niveau de ces crêtes.

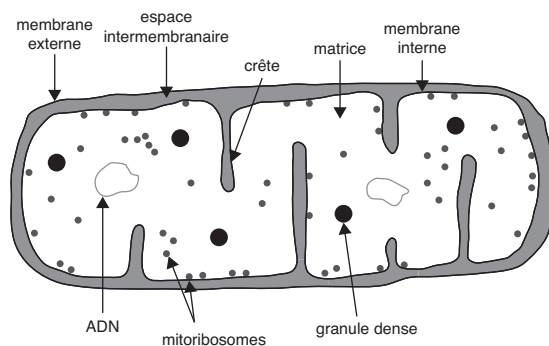


Figure A20.1 : Représentation schématique de l'organisation structurale de la mitochondrie*

* Source : http://biologie-enligne.univ-lille1.fr/biocellulaire/apprendre/chapitre10/ch10_page2.htm [consulté le 2 septembre 2020].

Parmi les fonctions mitochondriales, la respiration cellulaire tient une place prépondérante dans la production d'énergie. Elle est assurée grâce à une étroite connexion entre la glycolyse et la β -oxydation des acides gras qui se produisent dans le cytoplasme, et le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale.

La chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne mitochondriale, est composée d'une centaine d'éléments, protéiques et lipidiques, organisés en 4 complexes (I à IV) (figure A20.2). Elle est couplée avec l'ATP synthase

(parfois appelée complexe V), également localisée dans la membrane interne, qui accomplit la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP. La chaîne respiratoire est reliée au cycle de Krebs, qui lui fournit une partie des équivalents réduits (NADH, FADH₂) nécessaire à la synthèse d'ATP. Les électrons provenant du NADH et FADH₂ sont respectivement transmis aux complexes I et II, puis transitent par les complexes III et IV pour être enfin transmis au dioxygène, accepteur final. L'énergie ainsi libérée par le passage

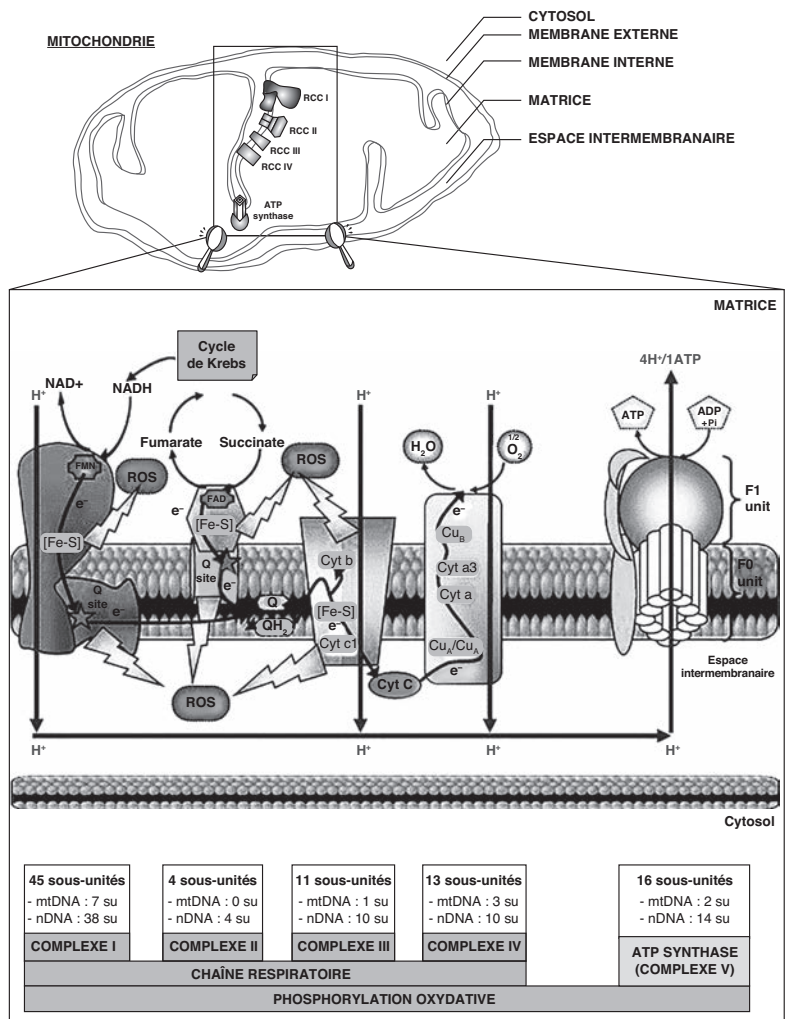


Figure A20.2 : Représentation schématique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du système de phosphorylation oxydative (d'après Lemarie et Grimm, 2011)

(Figure traduite de l'anglais)

des électrons d'un complexe au suivant est utilisée pour pomper des protons (H^+) par l'intermédiaire des complexes I, III et V, depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons crée un gradient de pH de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (le pH devient plus acide dans l'espace intermembranaire que dans la matrice) et engendre un potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) à travers la membrane interne de la mitochondrie dû au déséquilibre de charges positives. La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique qui est employé par l'ATP synthase qui catalyse la conversion d'ADP + P_i en ATP.

Pathologies liées à un déficit de la chaîne respiratoire

Les maladies mitochondriales, quelles que soient leurs causes, sont toutes des pathologies liées à un déficit de la chaîne respiratoire. Elles ont pour conséquences une déplétion en ATP, une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « *reactive oxygen species* »), un désordre de l'homéostasie des cations (Fe^{2+} , Ca^{2+}) et une acidose lactique. Elles peuvent survenir à tout âge de la vie, et toucher tous les organes, isolément ou en association, avec notamment des atteintes cardiaques, musculaires, ophtalmologiques, hématologiques, hépatiques, ou encore rénales. Elles ont des présentations cliniques très variées, allant d'atteintes localisées (cardiomyopathies, surdité, paragangliomes), à des syndromes multi-viscéraux (ataxie de Friedreich ; MELAS : encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique et pseudo-accidents vasculaires cérébraux ; MERRF : épilepsie myoclonique avec fibres rouges déchiquetées ; MNGIE : encéphalopathie gastro-intestinale myoneurogénique ; NARP : ataxie neurogénique avec rétinite pigmentaire) (figure A20.3).

L'atteinte des organes dépend des besoins des tissus et des cellules en ATP, métabolites, ions (Fe^{2+} , Ca^{2+}), et de la sensibilité de ces tissus et cellules au stress oxydant et à l'accumulation de certains métabolites. Ces pathologies sont particulièrement difficiles à diagnostiquer, car un même phénotype peut être causé par des mutations dans différents gènes et une mutation identique peut causer des phénotypes différents. Elles sont également difficiles à pronostiquer, ne disposant pour le moment d'aucune thérapie.

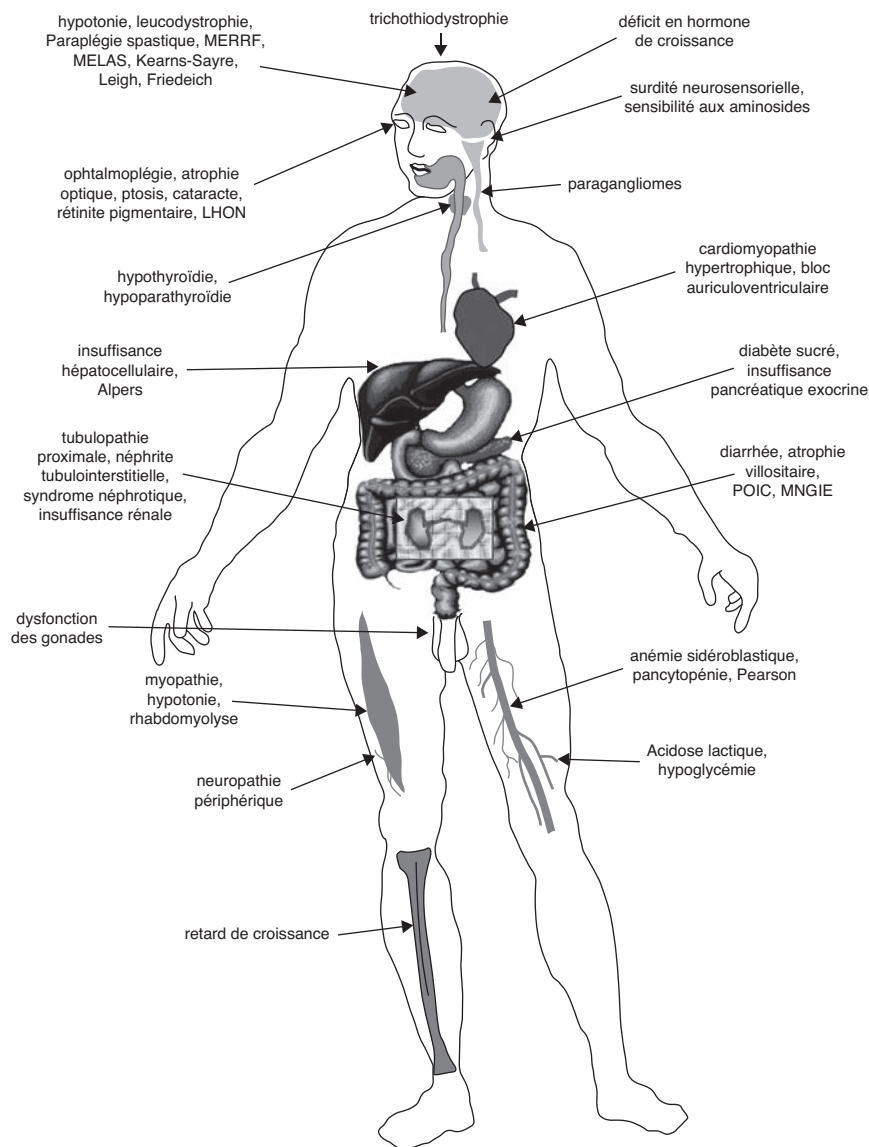


Figure A20.3 : Les maladies mitochondriales d'origine génétique peuvent toucher de nombreux organes, seuls ou en association, et donner lieu à des tableaux cliniques très variés (d'après Loublie et coll., 2009)

LHON : neuropathie optique héréditaire de Leber ; MELAS : encéphalomyopathie mitochondriale ; acidose lactique et pseudo-accidents vasculaires cérébraux ; MERRF :  pilepsie myoclonique avec fibres rouges d chiqu t es ; MNGIE : encéphalopathie gastro-intestinale myo- ou neurog n que ; POIC : pseudo-obstruction intestinale chronique.

Pesticides SDHi non autorisés au niveau européen

Tableau A20.I : Les pesticides SDHi non autorisés au niveau européen

Substances actives	Type de pesticide	Principaux types de traitement, cultures	Régions/pays où la SA est utilisée, date d'autorisation	Statut réglementaire européen
Cyénopirafène	Insecticide	Arboriculture, vigne	Japon (2009)	–
Inpyrfluxame	Fongicide	Parties aériennes ; arboriculture, légumes	Japon (2020)	Demande d'autorisation en cours d'examen
Isoflucyprame	Fongicide	Céréales	Nouvelle Zélande (2019)	Demande d'autorisation en cours d'examen
Fluindapyr	Fongicide	–	–	Demande d'autorisation en cours d'examen
Furametpyr	Fongicide	Riz	Japon (1996)	Objet d'une demande d'enregistrement préalable auprès de l'Echa
Pydiflumétofène	Fongicide	Parties aériennes ; céréales, maïs, cacahuètes, pommes de terre, vigne, melon, plantes ornementales	Argentine (2016), Uruguay, Australie	Demande d'autorisation en cours d'examen
Pyflubumide	Insecticide	–	Japon (2015), Corée	–
Pyraziflumid	Fongicide	Fruits, légumes	Japon (2018), Corée	–
Thifluzamide	Fongicide	Parties aériennes ; riz, pommes de terre, maïs, cacahuètes, coton, café	1997, Amérique du Sud, Asie	L'objet d'une demande d'enregistrement préalable auprès de l'Echa

Sources : Anses, 2019 ; *Pesticide Properties DataBase* (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> [consulté le 14 mai 2020]), rapports Efsa et Echa (*EU Pesticide Database* : <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> [consulté le 14 mai 2020]) et les sites des entreprises agrochimiques.

Algorithmes de recherche bibliographique pour identifier des études portant sur les effets sanitaires des fongicides SDHi

SDHi et pesticides (PubMed/Scopus/WoS)

((sdhi OR succinate dehydrogenase inhibitor OR succinate deshydrogenase inhibitor) and (pesticide* OR fungicide* OR insecticide OR acaricid* OR nematocid* OR herbicid*)) NOT (resistance OR synthesis)

Nom des familles SDHi et pesticides (PubMed/Scopus/WoS)

((‘Pyridine carboxamide’ OR ‘Oxathiin carboxamide’ OR ‘Furan carboxamide’ OR ‘Pyrazol carboxamide’ OR ‘Thiazole carboxamide’ OR ‘Phenyl benzamide OR carboxamide OR benzamide’) AND (pesticide* OR fungicide* OR insecticide OR acaricid* OR nematocid* OR herbicid*)) NOT (resistance OR synthesis)

SDHi et épidémiologie (PubMed)

(sdhi OR succinate dehydrogenase inhibitor OR succinate deshydrogenase inhibitor) AND (Epidemiolog*[tw] OR Epidemiologic Studies[mh] OR "Epidemiology"[Mh] OR epidemiology[sh] OR frequenc*[tw] OR prevalenc*[tw] OR Prevalence[mh] OR incidenc*[tw] OR trends[tw] OR mortalit*[tw] OR statistic*[tw] OR "statistics and numerical data"[Sh] OR estima*[tw] OR rate[tw] OR survey[tw] OR "prospective studies"[MeSH Terms] OR prospective stud*[tw] OR "cohort studies"[MeSH Terms] OR cohort*[tw] OR "follow-up studies"[MeSH Terms] OR follow-up[tw] OR "case-control studies"[MeSH Terms] OR "case-control"[tw] OR "Retrospective studies"[MeSH Terms] OR Retrospective stud*[tw] OR "longitudinal studies"[MeSH Terms] OR longitudinal[tw] OR "Cross-Sectional studies"[MeSH Terms] OR cross-sectional stud*[tw] OR "pilot projects"[MeSH Terms] OR pilot project*[tw] OR pilot stud*[tw] OR "multi-center study"[Publication Type] OR "Meta-Analysis"[Publication Type] OR "risk factors"[MeSH Terms] OR risk factor*[tw] OR associated factor*[tw] OR predict*[tw])

Nom des familles SDHi et épidémiologie (PubMed)

('Pyridine carboxamide' OR 'Oxathiin carboxamide' OR 'Furan carboxamide' OR 'Pyrazol carboxamide' OR 'Thiazole carboxamide' OR 'Phenyl benzamide') AND (Epidemiolog*[tw] OR Epidemiologic Studies[mh] OR "Epidemiology"[Mh] OR epidemiology[sh] OR frequenc*[tw] OR prevalenc*[tw] OR Prevalence[mh] OR incidenc*[tw] OR trends[tw] OR mortalit*[tw] OR statistic*[tw] OR "statistics and numerical data"[Sh] OR estima*[tw] OR rate[tw] OR survey[tw] OR "prospective studies"[MeSH Terms] OR prospective stud*[tw] OR "cohort studies"[MeSH Terms] OR cohort*[tw] OR "follow-up studies"[MeSH Terms] OR follow-up[tw] OR "case-control studies"[MeSH Terms] OR "case-control"[tw] OR "Retrospective studies"[MeSH Terms] OR Retrospective stud*[tw] OR "longitudinal studies"[MeSH Terms] OR longitudinal[tw] OR "Cross-Sectional studies"[MeSH Terms] OR cross-sectional stud*[tw] OR "pilot projects"[MeSH Terms] OR pilot project*[tw] OR pilot stud*[tw] OR "multicenter study"[Publication Type] OR "Meta-Analysis"[Publication Type] OR "risk factors"[MeSH Terms] OR risk factor*[tw] OR associated factor*[tw] OR predict*[tw])

Nom des substances actives SDHi¹¹⁶ et épidémiologie (PubMed)

(Benzovindiflupyr OR Solatenol OR Bixafen OR Boscalid OR Nicobifen OR Pristine OR Carboxin OR Fluopyram OR Flutolanil OR Fluxapyroxad OR Isofetamid OR Penflufen OR Penthiopyrad OR Sedaxane OR Isopyrazam OR Pydiflumetofen OR Fenfuram OR Mepronil) AND (Epidemiolog*[tw] OR Epidemiologic Studies[mh] OR "Epidemiology"[Mh] OR epidemiology[sh] OR frequenc*[tw] OR prevalenc*[tw] OR Prevalence[mh] OR incidenc*[tw] OR trends[tw] OR mortalit*[tw] OR statistic*[tw] OR "statistics and numerical data"[Sh] OR estima*[tw] OR rate[tw] OR survey[tw] OR "prospective studies"[MeSH Terms] OR prospective stud*[tw] OR "cohort studies"[MeSH Terms] OR cohort*[tw] OR "follow-up studies"[MeSH Terms] OR follow-up[tw] OR "case-control studies"[MeSH Terms] OR "case-control"[tw] OR "Retrospective studies"[MeSH Terms] OR Retrospective stud*[tw] OR "longitudinal studies"[MeSH Terms] OR longitudinal[tw] OR "Cross-Sectional studies"[MeSH Terms] OR cross-sectional stud*[tw] OR "pilot projects"[MeSH Terms] OR pilot project*[tw] OR pilot stud*[tw] OR "multicenter study"[Publication Type] OR "Meta-Analysis"[Publication Type] OR "risk factors"[MeSH Terms] OR risk factor*[tw] OR associated factor*[tw] OR predict*[tw])

SDHi et exposition des agriculteurs (PubMed/Scopus/WoS)

(sdhi OR succinate dehydrogenase inhibitor OR succinate deshydrogenase inhibitor) AND (farm* or worker*)

Traitement des semences et épidémiologie (PubMed)

Treat* seed AND (farmer* or agricultural practice* or personal exposure or farm work or worker exposure) AND (Epidemiolog*[tw] OR Epidemiologic Studies[mh] OR "Epidemiology"[Mh] OR epidemiology[sh] OR frequenc*[tw] OR prevalenc*[tw] OR Prevalence[mh] OR incidenc*[tw] OR trends[tw] OR mortalit*[tw] OR statistic*[tw] OR "statistics and numerical data"[Sh] OR estima*[tw] OR rate[tw] OR survey[tw] OR "prospective studies"[MeSH Terms] OR prospective stud*[tw] OR "cohort studies"[MeSH Terms] OR cohort*[tw] OR "follow-up studies"[MeSH Terms] OR follow-up[tw] OR "case-control studies"[MeSH Terms] OR "case-control"[tw] OR "Retrospective studies"[MeSH Terms] OR Retrospective stud*[tw] OR "longitudinal studies"[MeSH Terms] OR longitudinal[tw] OR "Cross-Sectional studies"[MeSH Terms] OR cross-sectional stud*[tw] OR "pilot

116. FRAC classe 7 ; <https://www.frac.info/knowledge-database/downloads> [consulté le 12 mai 2020] et IRAC classe 25 ; <https://irac-online.org/modes-of-action/> [consulté le 16 juin 2020].

projects"[MeSH Terms] OR pilot project*[tw] OR pilot stud*[tw] OR "multicenter study"[Publication Type] OR "Meta-Analysis"[Publication Type] OR "risk factors"[MeSH Terms] OR risk factor*[tw] OR associated factor*[tw] OR predict*[tw])

Traitement des semences et exposition des agriculteurs (PubMed)

Treat* seed AND (farmer* OR agricultural practice* OR personal exposure OR farm work OR worker exposure) AND (pesticide* OR fungicide* OR insecticide OR acaricid* OR nematocid* OR herbicid*)

Exposition des agriculteurs lors du traitement des pommes de terre (PubMed/Scopus/WoS)

potato* AND (farm* or worker*) AND exposure

RÉFÉRENCES

- Un ou plusieurs auteurs sont affiliés à une industrie des phytosanitaires.

Ackrell BA. Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* 2000 ; 466 : 1-5.

Afssa. *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009 : 308 p., <https://www.anses.fr/en/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>

Akyil D, Ozkara A, Erdogmus SF, *et al.* Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Benodanil by using *Allium* and Micronucleus assays. *Drug Chem Toxicol* 2016 ; 39 : 35-40.

Alston CL, Davison JE, Meloni F, *et al.* Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* 2012 ; 49 : 569-77.

Alves PR, Cardoso EJ, Martines AM, *et al.* Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere* 2013 ; 90 : 2674-82.

Amar L, Baudin E, Burnichon N, *et al.* Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 92 : 3822-8.

Andrews KA, Ascher DB, Pires DEV, *et al.* Tumour risks and genotype-phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet* 2018 ; 55 : 384-94.

deshydrogénase (SDHI). *Rapport d'expertise collective*. "GECU SDHI". Anses. Paris, 2019 : 1-103, consulté le 13/01/20 :

<https://www.anses.fr/fr/system/files/PHYTO2018SA0113Ra.pdf>

Artz DR, Pitts-Singer TL. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0135688.

Aspuria PP, Lunt SY, Våremo L, *et al.* Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. *Cancer Metab* 2014 ; 2 : 21.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, *et al.* *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux : Expertise scientifique collective, synthèse du rapport*. France : INRA et Cemagref, 2005.

Battilani P, Toscano P, van der Fels-Klerx HJ, *et al.* Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 24328.

Bausch B, Schiavi F, Ni Y, *et al.* Clinical characterization of the pheochromocytoma and paraganglioma susceptibility genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for gene-informed prevention. *JAMA Oncol* 2017 ; 3 : 1204-12.

Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, *et al.* Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000 ; 287 : 848-51.

Bénit P, Kahn A, Chretien D, *et al.* Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. *PLoS One* 2019 : e0224132.

Bénit P, Bortoli S, Chrétien D, *et al.* Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs. *Rev Francoph Lab* 2018 ; 5947 : 1.

Béranger R, Hardy EM, Binter A-C, *et al.* Multiple pesticides in mothers' hair samples and children's measurements at birth: Results from the French national birth cohort (ELFE). *Int J Hyg Environ Health* 2020 ; 223 : 22-33.

Béranger R, Hardy EM, Dexet C, *et al.* Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: Results from the ELFE national birth cohort. *Environ Int* 2018 ; 120 : 43-53.

Bernaudin M, Nedelec A-S, Divoux D, *et al.* Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002 ; 22 : 393-403.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000 ; 3 : 1301-6.

Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, *et al.* Mitochondrial complex II: at the crossroads. *Trends Biochem Sci* 2017 ; 42 : 312-25.

Bony S, Gillet C, Bouchez A, *et al.* Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquat Toxicol* 2008 ; 89 : 197-203.

Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, *et al.* IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol* 2006 ; 36 : 781-92. •

Botias C, David A, Hill EM, *et al.* Quantifying exposure of wild bumblebees to mixtures of agrochemicals in agricultural and urban landscapes. *Environ Pollut* 2017 ; 222 : 73-82.

Boulanger M, Tual S, Lemarchand C, *et al.* Agricultural exposure and risk of bladder cancer in the AGRiculture and CANcer cohort. *Int Arch Occup Environ Health* 2017 ; 90 : 169-78.

Brenet A, Hassan-Abdi R, Soussi-Yanicostas N. Bixafen, a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, causes microcephaly and motor neuron axon defects during development. *Chemosphere* 2020 : 128781.

Brière J-J, Favier J, El Ghouzzi V, *et al.* Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cell Mol Life Sci* 2005 ; 62 : 2317-24.

Burnichon N, Buffet A, Parfait B, *et al.* Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Hum Mol Genet* 2012 ; 21 : 5397-405.

Burnichon N, Brière J-J, Libé R, *et al.* SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 3011-20.

C.E. Review report for the active substance Boscalid : Commission européenne, 2008 : 27 p. [consulté le 16/02/21 :

https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=as.details&as_id=472

Calió A, Grignon DJ, Stohr BA, *et al.* Renal cell carcinoma with TFE3 translocation and succinate dehydrogenase B mutation. *Mod Pathol* 2017 ; 30 : 407-15.

Campbell JB, Nath R, Gadau J, *et al.* The fungicide Pristine(R) inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *J Insect Physiol* 2016 ; 86 : 11-6.

Casey RT, ten Hoopen R, Ochoa E, *et al.* SDHC epi-mutation testing in gastrointestinal stromal tumours and related tumours in clinical practice. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 10244.

Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, *et al.* Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet* 2014 ; 23 : 2440-6.

Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* 2003 ; 72 : 77-109.

Cervera AM, Bayley J-P, Devilee P, *et al.* Inhibition of succinate dehydrogenase dysregulates histone modification in mammalian cells. *Mol Cancer* 2009 ; 8 : 89.

Cochemé HM, Murphy MP. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 1786-98.

Commissariat général au développement durable. *Les pesticides dans les cours d'eau français en 2013* : Commissariat général au développement durable, 2015 : 12 p., consulté le 13/01/20 :

<https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/sites/default/files/2018-10/chiffres-stats697-pesticides-dans-cours-deau2013-novembre2015.pdf>

Costello S, Cockburn M, Bronstein J, *et al.* Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 2009 ; 169 : 919-26.

Courage C, Jackson CB, Hahn D, *et al.* SDHA mutation with dominant transmission results in complex II deficiency with ocular, cardiac, and neurologic involvement. *Am J Med Genet A* 2017 ; 173 : 225-30.

Crona J, Delgado Verdugo A, Maharjan R, *et al.* Somatic mutations in H-RAS in sporadic pheochromocytoma and paraganglioma identified by exome sequencing. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 98 : E1266-1271.

Dahia PLM. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 2014 ; 14 : 108-19.

Daniele G, Giroud B, Jabot C, *et al.* Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018 ; 25 : 6145-53.

David A, Botías C, Abdul-Sada A, *et al.* Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ Int* 2016 ; 88 : 169-78.

DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Watkins Dejong E, *et al.* Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *J Econ Entomol* 2015 ; 108 : 2518-28.

Domico LM, Zeevalk GD, Bernard LP, *et al.* Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* 2006 ; 27 : 816-25.

Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019 ; 20 : 69-84.

Du B, Shim JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules* 2016 ; 21 : 964.

Dubard Gault M, Mandelker D, DeLair D, *et al.* Germline SDHA mutations in children and adults with cancer. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2018 ; 4 : a002584.

Dwight T, Mann K, Benn DE, *et al.* Familial SDHA mutation associated with pituitary adenoma and pheochromocytoma/paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013a ; 98 : E1103-8.

Dwight T, Benn DE, Clarkson A, *et al.* Loss of SDHA expression identifies SDHA mutations in succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2013b ; 37 : 226-33.

Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, *et al.* Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. *Biol Signals Recept* 2001 ; 10 : 224-53.

Echa. *CLH report for isoflucypram*: European Chemicals Agency (ECHA), 2018 : 92 p., <https://echa.europa.eu/documents/10162/fffcc1f5-d105-1cf1-6ea1-72d9efee853d>

Efsa. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* 2020 ; 18.

Efsa. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penflufen. *EFSA J* 2016 ; 14 : 4605.

Efsa. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzovindiflupyr. *EFSA J* 2015 ; 13 : 4043.

Efsa. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. *EFSA J* 2013 ; 11 : 3052.

Eichner LJ, Perry M-C, Dufour CR, *et al.* miR-378 (*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell Metab* 2010 ; 12 : 352-61.

Elcombe CR, Peffer RC, Wolf DC, *et al.* Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Crit Rev Toxicol* 2014 ; 44 : 64-82. •

Elskus AA, Smalling KL, Hladik ML, *et al.* Effects of two fungicide formulations on microbial and macroinvertebrate leaf decomposition under laboratory conditions. *Environ Toxicol Chem* 2016 ; 35 : 2834-44.

EPA. *Inpyrfluxam: Ecological hazard comparison in support of the registration decision*. Washington, DC : United States Environmental Protection Agency, 2020 : 5 p., <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2018-0038-0020>

EPA. *Environmental fate and ecological risk assessment for boscalid. New uses on alfalfa and citrus (group 10)*. Washington (DC) : US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division, 2010 : 162 p. : https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-128008_19-Feb-10_a.pdf

Esteve-Turrillas FA, Agulló C, Abad-Somovilla A, *et al.* Fungicide multiresidue monitoring in international wines by immunoassays. *Food Chem* 2016 ; 196 : 1279-86.

Favier J, Buffet A, Gimenez-Roqueplo A-P. HIF2A mutations in paraganglioma with polycythemia. *N Engl J Med* 2012 ; 367 : 2161 ; author reply 2161-2162.

Felter SP, Foreman JE, Boobis A, *et al.* Human relevance of rodent liver tumors: Key insights from a Toxicology Forum workshop on nongenotoxic modes of action. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018 ; 92 : 1-7. •

FRAC. *FRAC Code List 2020: Fungal control agents by cross resistance pattern and mode of action*. FRAC, 2020, consulté le 11/02/2021 : <https://www.frac.info/knowledge-database/downloads>

Fuhrmann DC, Wittig I, Brüne B. TMEM126B deficiency reduces mitochondrial SDH oxidation by LPS, attenuating HIF-1 α stabilization and IL-1 β expression. *Redox Biol* 2019 ; 20 : 204-16.

Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med* 2017 ; 104 : 144-64.

Gandar A, Laffaille P, Canlet C, *et al.* Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 2017 ; 188 : 60-72.

Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 2013 ; 155 : 750-64.

Gill AJ. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology* 2018 ; 72 : 106-16.

Gimenez-Roqueplo A-P. New advances in the genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2006 ; 1073 : 112-21.

Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P, *et al.* Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 5615-21.

Goffrini P, Ercolino T, Panizza E, *et al.* Functional study in a yeast model of a novel succinate dehydrogenase subunit B gene germline missense mutation (C191Y) diagnosed in a patient affected by a glomus tumor. *Hum Mol Gen* 2009 ; 18 : 1860-8.

Grey WE, Marthre DE, Rogers SJ. Potential exposure of commercial seed-treating applicators to the pesticides carboxin-thiram and lindane. *Bull Environ Contam Toxicol* 1983 ; 31 : 244-50.

Guo J, Lemire BD. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 47629-35.

Guzy RD, Sharma B, Bell E, *et al.* Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2008 ; 28 : 718-31.

Habano W, Sugai T, Nakamura S-I, *et al.* Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep* 2003 ; 10 : 1375-80.

Her YF, Nelson-Holte M, Maher LJ. Oxygen concentration controls epigenetic effects in models of familial paraganglioma. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0127471.

Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, *et al.* Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 7309-16. •

Huang S, Millar AH. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 2013 ; 16 : 344-9.

- Hurley PM. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect* 1998 ; 106 : 437-45.
- Hyland C, Bradman A, Gerona R, *et al.* Organic diet intervention significantly reduces urinary pesticide levels in US children and adults. *Environ Res* 2019 ; 171 : 568-75.
- Inaoka DK, Shiba T, Sato D, *et al.* Structural insights into the molecular design of flutolanil derivatives targeted for fumarate respiration of parasite mitochondria. *Int J Mol Sci* 2015 ; 16 : 15287-308.
- Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, *et al.* Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol* 2020 ; 94 : 2899-923. •
- JMPR. *Pesticide residues in food 2009. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group*. Rome, Italy : Fao, 2009 : 434 p., consulté le 15/06/20 : <http://www.fao.org/3/a-i1277e.pdf>
- Karlsson AS, Weihermüller L, Tappe W, *et al.* Field scale boscalid residues and dissipation half-life estimation in a sandy soil. *Chemosphere* 2016 ; 145 : 163-73.
- Kelly L, Bryan K, Kim SY, *et al.* Post-transcriptional dysregulation by miRNAs is implicated in the pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor [GIST]. *PLoS One* 2013 ; 8 : e64102.
- Kikutake K, Furuya T, Hasebe M, *et al.* Development of a novel fungicide, pyraziflumid. *J Pestic Sci* 2020 ; 45 : 184-90. •
- Killian JK, Kim SY, Miettinen M, *et al.* Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Discov* 2013 ; 3 : 648-57.
- Kugathas S, Audouze K, Ermler S, *et al.* Effects of common pesticides on prostaglandin D2 (PGD2) inhibition in SC5 mouse Sertoli cells, evidence of binding at the COX-2 active site, and implications for endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 2016 ; 124 : 452-9.
- Lalève A, Gamet S, Walker A-S, *et al.* Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ Microbiol* 2014 ; 16 : 2253-66. •
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 ; 15 : 178-96.
- Laukka T, Mariani CJ, Ihantola T, *et al.* Fumarate and succinate regulate expression of hypoxia-inducible genes via TET enzymes. *J Biol Chem* 2016 ; 291 : 4256-65.
- Lee D, Kondo H, Kuwayama Y, *et al.* Total synthesis of 4-epi-atpenin A5 as a potent nematode complex II inhibitor. *Tetrahedron* 2019 ; 75 : 3178-85.

- Lee HJ, Ryu D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: public health perspectives of their co-occurrence. *J Agric Food Chem* 2017 ; 65 : 7034-51.
- Lee MR, Mantel C, Lee SA, *et al.* MiR-31/SDHA Axis regulates reprogramming efficiency through mitochondrial metabolism. *Stem Cell Reports* 2016 ; 7 : 1-10.
- Lemarchand C, Tual S, Boulanger M, *et al.* Prostate cancer risk among French farmers in the AGRICAN cohort. *Scand J Work Environ Health* 2016 ; 42 : 144-52.
- Lemarie A, Grimm S. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene* 2011 ; 30 : 3985-4003.
- Lemarie A, Huc L, Pazarentzos E, *et al.* Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell Death Differ* 2011 ; 18 : 338-49.
- Lemos RS, Fernandes AS, Pereira MM, *et al.* Quinol: fumarate oxidoreductases and succinate: quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1553 : 158-70.
- Lentola A, David A, Abdul-Sada A, *et al.* Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. *Environ Pollut* 2017 ; 228 : 297-304.
- Lepoutre-Lussey C, Thibault C, Buffet A, *et al.* From Nf1 to Sdhb knockout: Successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma. *Mol Cell Endocrinol* 2016 ; 421 : 40-8.
- Lesmes-Fabian C, Binder CR. Pesticide flow analysis to assess human exposure in greenhouse flower production in Colombia. *Int J Environ Res Public Health* 2013 ; 10 : 1168-85.
- Letouzé E, Martinelli C, Lorient C, *et al.* SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 2013 ; 23 : 739-52.
- Levitas A, Muhammad E, Harel G, *et al.* Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase. *Eur J Hum Genet* 2010 ; 18 : 1160-5.
- Liao L-H, Wu W-Y, Dad A, *et al.* Fungicide suppression of flight performance in the honeybee (*Apis mellifera*) and its amelioration by quercetin. *Proc Biol Sci* 2019 ; 286 : 20192041.
- Li J, Liang N, Long X, *et al.* SDHC-related deficiency of SDH complex activity promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via ROS/NF κ B signaling. *Cancer Lett* 2019 ; 461 : 44-55.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006 ; 443 : 787-95.
- Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010 ; 44 : 479-96.
- Li W, Yuan M, Wu Y, *et al.* Bixafen exposure induces developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Res* 2020a ; 189 : 109923.

- Li W, Wu Y, Yuan M, *et al.* Fluxapyroxad induces developmental delay in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2020b ; 256 : 127037.
- Loriot C, Domingues M, Berger A, *et al.* Deciphering the molecular basis of invasiveness in *Sdhb*-deficient cells. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 32955-65.
- Loriot C, Burnichon N, Gadessaud N, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 ; 97 : E954-962.
- Loublier S, Schiff M, Bénit P, *et al.* Les maladies mitochondriales : une médecine à part ? *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2009 ; 24 : 240-53.
- Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance. *Adv Appl Microbiol* 2015 ; 90 : 29-92.
- Lussey-Lepoutre C, Buffet A, Gimenez-Roqueplo A-P, *et al.* Mitochondrial deficiencies in the predisposition to paraganglioma. *Metabolites* 2017 ; 7 : 17.
- Malinoc A, Sullivan M, Wiech T, *et al.* Biallelic inactivation of the SDHC gene in renal carcinoma associated with paraganglioma syndrome type 3. *Endocr Relat Cancer* 2012 ; 19 : 283-90.
- Mathew MD, Mathew ND, Miller A, *et al.* Using *C. elegans* forward and reverse genetics to identify new compounds with anthelmintic activity. *PLoS Negl Trop Dis* 2016 ; 10 : e0005058.
- Ma YY, Wu TF, Liu YP, *et al.* Two compound frame-shift mutations in succinate dehydrogenase gene of a Chinese boy with encephalopathy. *Brain Dev* 2014 ; 36 : 394-8.
- McDonald OG, Wu H, Timp W, *et al.* Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 867-74.
- Meek ME, Boobis A, Cote I, *et al.* New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J Appl Toxicol* 2014 ; 34 : 1-18.
- Merlo A, Bernardo-Castiñeira C, Sáenz-de-Santa-María I, *et al.* Role of VHL, HIF1A and SDH on the expression of miR-210: Implications for tumoral pseudo-hypoxic fate. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 6700-17.
- Miettinen M, Lasota J. Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) - a review. *Int J Biochem Cell Biol* 2014 ; 53 : 514-9.
- Miyadera H, Shiomi K, Ui H, *et al.* Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 473-7.
- Moosavi B, Berry EA, Zhu X-L, *et al.* The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cell Mol Life Sci* 2019 ; 76 : 4023-42.
- Myung K, Klittich CJR. Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs? *Drug Discov Today* 2015 ; 20 : 7-10.
- Nakano M, Yasokawa N, Suwa A, *et al.* Mode of action of novel acaricide pyflubumide: Effects on the mitochondrial respiratory chain. *J Pestic Sci* 2015 ; 40 : 19-24. •

- Nath K, Guo L, Nancolas B, *et al.* Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochim Biophys Acta* 2016 ; 1866 : 151-62.
- Navarro A, Báñez MJ, Gómez C, *et al.* Effects of rotenone and pyridaben on complex I electron transfer and on mitochondrial nitric oxide synthase functional activity. *J Bioenerg Biomembr* 2010 ; 42 : 405-12.
- Neumann HPH, Pawlu C, Peczkowska M, *et al.* Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 2004 ; 292 : 943-51.
- Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, *et al.* Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016 ; 53 : 4094-125.
- Ni Y, Seballos S, Ganapathi S, *et al.* Germline and somatic SDHx alterations in apparently sporadic differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015 ; 22 : 121-30.
- Nougadère A, Sirot V, Cravedi J-P, *et al.* Dietary exposure to pesticide residues and associated health risks in infants and young children - Results of the French infant total diet study. *Environ Int* 2020 ; 137 : 105529.
- Nougadère A, Sirot V, Kadar A, *et al.* Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ Int* 2012 ; 45 : 135-50.
- Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J* 2015 ; 282 : 2796-805.
- Ohlenbusch A, Edvardson S, Skorpen J, *et al.* Leukoencephalopathy with accumulated succinate is indicative of SDHAF1 related complex II deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2012 ; 7 : 69.
- Oka Y, Saroya Y. Effect of fluensulfone and fluopyram on the mobility and infection of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Pest Manag Sci* 2019 ; 75 : 2095-106.
- Oudijk L, de Krijger RR, Rapa I, *et al.* H-RAS mutations are restricted to sporadic pheochromocytomas lacking specific clinical or pathological features: data from a multi-institutional series. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 ; 99 : E1376-1380.
- Paranagama MP, Kita K. Differential effect of atpenin A5 on ROS production from wild-type mitochondrial complex II in human cancer cells and normal cells. *Mitochondrial Diseases* 2017 : 87.
- Parfait B, Chrétien D, Rötig A, *et al.* Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum Genet* 2000 ; 106 : 236-43.
- Paris L, Peghaire E, Moné A, *et al.* Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol* 2020 ; 172 : 107348.
- Peffer RC, Cowie DE, Currie RA, *et al.* Sedaxane-use of nuclear receptor transactivation assays, toxicogenomics, and toxicokinetics as part of a mode of action framework for rodent liver tumors. *Toxicol Sci* 2018 ; 162 : 582-98. •

- Peters JP, Her YF, Maher LJ. Modeling dioxygenase enzyme kinetics in familial paraganglioma. *Biol Open* 2015 ; 4 : 1281-9.
- Piel C, Pouchieu C, Tual S, *et al.* Central nervous system tumors and agricultural exposures in the prospective cohort AGRICAN. *Int J Cancer* 2017 ; 141 : 1771-82.
- Piruat JI, Millán-Uclés A. Genetically modeled mice with mutations in mitochondrial metabolic enzymes for the study of cancer. *Front Oncol* 2014 ; 4 : 200.
- Plummer SM, Wright J, Currie RA. Dose-dependent effects on rat liver miRNAs 200a/b and 429: potential early biomarkers of liver carcinogenesis. *Toxicol Rep* 2018 ; 5 : 309-13. •
- Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, *et al.* Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Gen* 2005 ; 14 : 2231-9.
- Powers JF, Cochran B, Baleja JD, *et al.* A xenograft and cell line model of SDH-deficient pheochromocytoma derived from Sdhb+/- rats. *Endocr Relat Cancer* 2020 ; 27 : 337-54.
- Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* 2017 ; 387 : 95-105.
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 488-94.
- Puisségur M-P, Mazure NM, Bertero T, *et al.* miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 2011 ; 18 : 465-78.
- Qian L, Qi S, Wang Z, *et al.* Environmentally relevant concentrations of boscalid exposure affects the neurobehavioral response of zebrafish by disrupting visual and nervous systems. *J Hazard Mater* 2021 ; 404 : 124083.
- Qian L, Qi S, Cao F, *et al.* Effects of penthiopyrad on the development and behaviour of zebrafish in early-life stages. *Chemosphere* 2019a ; 214 : 184-94.
- Qian L, Zhang J, Chen X, *et al.* Toxic effects of boscalid in adult zebrafish (*Danio rerio*) on carbohydrate and lipid metabolism. *Environ Pollut* 2019b ; 247 : 775-82.
- Qian L, Cui F, Yang Y, *et al.* Mechanisms of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. *Sci Total Environ* 2018a ; 634 : 478-87.
- Qian L, Qi S, Cao F, *et al.* Toxic effects of boscalid on the growth, photosynthesis, antioxidant system and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Environ Pollut* 2018b ; 242 : 171-81.
- Ren Y, Yang N, Yue Y, *et al.* Investigation of novel pyrazole carboxamides as new apoptosis inducers on neuronal cells in *Helicoverpa zea*. *Bioorg Med Chem* 2018 ; 26 : 2280-6.
- Rouquié D, Tinwell H, Blanck O, *et al.* Thyroid tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of hepatic CAR/PXR nuclear receptors. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014 ; 70 : 673-80. •

- Ruprecht J, Yankovskaya V, Maklashina E, *et al.* Structure of Escherichia coli succinate: quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 29836-46.
- Rustin P, Rötig A. Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1553 : 117-22.
- Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, *et al.* Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012 ; 1820 : 643-51.
- Sciacovelli M, Frezza C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J* 2017 ; 284 : 3132-44.
- Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, *et al.* Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* 2016 ; 537 : 544-7.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005 ; 7 : 77-85.
- Selby TP, Hughes KA, Rauh JJ, *et al.* Synthetic atpenin analogs: Potent mitochondrial inhibitors of mammalian and fungal succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Bioorg Med Chem Lett* 2010 ; 20 : 1665-8.
- Shimizu T, Inoue K, Hachiya H, *et al.* Frequent alteration of the protein synthesis of enzymes for glucose metabolism in hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol.* 2014 ; 49 : 1324-32.
- Siebers EM, Choi MJ, Tinklenberg JA, *et al.* Sdha $\pm$ rats display minimal muscle pathology without significant behavioral or biochemical abnormalities. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018 ; 77 : 665-72.
- Sierotzki H, Scalliet G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 2013 ; 103 : 880-7. •
- Silva V, Mol HGJ, Zomer P, *et al.* Pesticide residues in European agricultural soils - A hidden reality unfolded. *Sci Total Environ* 2019 ; 653 : 1532-45.
- Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, *et al.* Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 7241.
- Sinclair GM, O'Brien AL, Keough M, *et al.* Using metabolomics to assess the sub-lethal effects of zinc and boscalid on an estuarine polychaete worm over time. *Metabolomics* 2019 ; 15 : 108.
- Slane BG, Aykin-Burns N, Smith BJ, *et al.* Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O₂·, oxidative stress, and genomic instability. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 7615-20.
- Smith EH, Janknecht R, Maher LJ. Succinate inhibition of alpha-ketoglutarate-dependent enzymes in a yeast model of paraganglioma. *Hum Mol Gen* 2007 ; 16 : 3136-48.

Sun F, Huo X, Zhai Y, *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 2005 ; 121 : 1043-57.

Szeto SSW, Reinke SN, Sykes BD, *et al.* Ubiquinone-binding site mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase generate superoxide and lead to the accumulation of succinate. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 27518-26.

Takahata S, Kubota N, Takei-Masuda N, *et al.* Mechanism of action of ME1111, a novel antifungal agent for topical treatment of onychomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2016 ; 60 : 873-80.

Tamura M, Matsui H, Tomita T, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *J Clin Biochem Nutr* 2014 ; 54 : 12-7.

Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 2013 ; 19 : 1438-49.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 2011 ; 119 : 866-72.

Tawara T, Fukushima T, Hojo N, *et al.* Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Arch Toxicol* 1996 ; 70 : 585-9.

Teng M, Wang C, Song M, *et al.* Chronic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to flutolanil leads to endocrine disruption and reproductive disorders. *Environ Res* 2020 ; 184 : 109310.

Teng M, Zhou Y, Song M, *et al.* Chronic toxic effects of flutolanil on the liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Chem Res Toxicol* 2019 ; 32 : 995-1001.

Teng M, Zhu W, Wang D, *et al.* Acute exposure of zebrafish embryo (*Danio rerio*) to flutolanil reveals its developmental mechanism of toxicity via disrupting the thyroid system and metabolism. *Environ Pollut* 2018 ; 242 : 1157-65.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009 ; 139 : 871-90.

Tinwell H, Rouquié D, Schorsch F, *et al.* Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014 ; 70 : 648-58. •

Toumi K, Joly L, Vleminckx C, *et al.* Biological monitoring of exposure to pesticide residues among Belgian florists. *Hum Ecol Risk Assess* 2020 ; 26 : 636-53.

Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* 2019 ; 18 : e13031.

Tsang VHM, Dwight T, Benn DE, *et al.* Overexpression of miR-210 is associated with SDH-related pheochromocytomas, paragangliomas, and gastrointestinal stromal tumours. *Endocr Relat Cancer* 2014 ; 21 : 415-26.

Tseng P-L, Wu W-H, Hu T-H, *et al.* Decreased succinate dehydrogenase B in human hepatocellular carcinoma accelerates tumor malignancy by inducing the Warburg effect. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 1-16.

- Urbini M, Astolfi A, Indio V, *et al.* SDHC methylation in gastrointestinal stromal tumors (GIST): a case report. *BMC Med Genet* 2015 ; 16 : 87.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009 ; 324 : 1029-33.
- Vasanthakumar A, Godley LA. 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy. *Cancer Genet* 2015 ; 208 : 167-77.
- Velki M, Weltmeyer A, Seiler TB, *et al.* Acute toxicities and effects on multixenobiotic resistance activity of eight pesticides to the earthworm *Eisenia andrei*. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019 ; 26 : 4821-32.
- Wade A, Lin C-H, Kurkul C, *et al.* Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. *Insects* 2019 ; 10 : 20.
- Wang A, Costello S, Cockburn M, *et al.* Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol* 2011 ; 26 : 547-55.
- Wang H, Meng Z, Liu F, *et al.* Characterization of boscalid-induced oxidative stress and neurodevelopmental toxicity in zebrafish embryos. *Chemosphere* 2020 ; 238 : 124753.
- Wang H, Chen Y, Wu G. SDHB deficiency promotes TGF β -mediated invasion and metastasis of colorectal cancer through transcriptional repression complex SNAIL1-SMAD3/4. *Transl Oncol* 2016 ; 9 : 512-20.
- Wentzel JF, Lewies A, Bronkhorst AJ, *et al.* Exposure to high levels of fumarate and succinate leads to apoptotic cytotoxicity and altered global DNA methylation profiles in vitro. *Biochimie* 2017 ; 135 : 28-34.
- Wu S, Lei L, Liu M, *et al.* Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to *Xenopus tropicalis* embryos. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018 ; 153 : 8-15.
- Xiao M, Yang H, Xu W, *et al.* Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 1326-38.
- Yang Y, Dong F, Liu X, *et al.* Developmental toxicity by thifluzamide in zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of leptin. *Chemosphere* 2019a ; 221 : 863-9.
- Yang Y, Dong F, Liu X, *et al.* Dysregulation of circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by thifluzamide: Involvement of positive and negative regulators. *Chemosphere* 2019b ; 235 : 280-7.
- Yang Y, Dong F, Liu X, *et al.* Flutolanil affects circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by disrupting the positive regulators. *Chemosphere* 2019c ; 228 : 649-55.
- Yang Y, Dong F, Liu X, *et al.* Crosstalk of oxidative damage, apoptosis, and autophagy under endoplasmic reticulum (ER) stress involved in thifluzamide-induced liver damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 2018a ; 243 : 1904-11.
- Yang Y, Dong F, Liu X, *et al.* Thifluzamide affects lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ* 2018b ; 633 : 1227-36.
- Yang Y, Liu W, Li D, *et al.* Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide. *Chemosphere* 2017 ; 183 : 89-96.

- Yang Y, Liu W, Mu X, *et al.* Biological response of zebrafish embryos after short-term exposure to thifluzamide. *Sci Rep* 2016a ; 6 : 38485.
- Yang Y, Qi S, Wang D, *et al.* Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *J Hazard Mater* 2016b ; 307 : 127-36.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, *et al.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 2003 ; 299 : 700.
- Yao H, Xu X, Zhou Y, *et al.* Impacts of isopyrazam exposure on the development of early-life zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res Int* 2018a ; 25 : 23799-808.
- Yao H, Yu J, Zhou Y, *et al.* The embryonic developmental effect of sedaxane on zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 2018b ; 197 : 299-305.
- Yao X, Zhang F, Qiao Z, *et al.* Toxicity of thifluzamide in earthworm (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2020 ; 188 : 109880.
- Ye X, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol* 2015 ; 25 : 675-86.
- Yin YN, Kim YK, Xiao CL. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 2011 ; 101 : 986-95.
- Zhang J, Fitsanakis VA, Gu G, *et al.* Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* 2003 ; 84 : 336-46.
- Zhao T, Mu X, You Q. Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 53819-28.