



(ID Modèle = 454988)

Ineris - 181216 - 1994313 - v4.0

11/02/2021

Vers une meilleure prise en compte de la perturbation endocrine dans les normes de qualité environnementale – Phase II : application du guide européen d'identification des perturbateurs endocriniens pour les pesticides & biocides et implications pour l'établissement des valeurs seuils.

Une étude de cas : le tébuconazole

PRÉAMBULE

Ce rapport a été réalisé dans le cadre de la Convention de coopération -AFB/2019/110- relative au programme de travail 2019/2020 « connaissance, compréhension et gestion des polluants et de leurs effets dans l'eau et les milieux aquatiques en appui la mise en œuvre du plan national micropolluants » 2019 entre l'AFB et l'Ineris.

Le présent document a été réalisé au titre de la mission d'appui aux pouvoirs publics confiée à l'Ineris, en vertu des dispositions de l'article R131-36 du Code de l'environnement.

La responsabilité de l'Ineris ne peut pas être engagée, directement ou indirectement, du fait d'inexactitudes, d'omissions ou d'erreurs ou tous faits équivalents relatifs aux informations utilisées.

L'exactitude de ce document doit être appréciée en fonction des connaissances disponibles et objectives et, le cas échéant, de la réglementation en vigueur à la date d'établissement du document. Par conséquent, l'Ineris ne peut pas être tenu responsable en raison de l'évolution de ces éléments postérieurement à cette date. La mission ne comporte aucune obligation pour l'Ineris d'actualiser ce document après cette date.

Au vu de ses missions qui lui incombent, l'Ineris, n'est pas décideur. Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient proposés par l'Ineris dans le cadre des missions qui lui sont confiées, ont uniquement pour objectif de conseiller le décideur dans sa prise de décision. Par conséquent, la responsabilité de l'Ineris ne peut pas se substituer à celle du décideur qui est donc notamment seul responsable des interprétations qu'il pourrait réaliser sur la base de ce document. Tout destinataire du document utilisera les résultats qui y sont inclus intégralement ou sinon de manière objective. L'utilisation du document sous forme d'extraits ou de notes de synthèse s'effectuera également sous la seule et entière responsabilité de ce destinataire. Il en est de même pour toute autre modification qui y serait apportée. L'Ineris dégage également toute responsabilité pour chaque utilisation du document en dehors de l'objet de la mission.

Nom de la Direction en charge du rapport : Direction Milieux et Impacts sur le Vivant

Rédaction : JAMES Alice – MIRNEJAD Peyam

Vérification : ANDRES Sandrine

Approbation : Document approuvé le 11/02/2021 par GREAUD LAURIANE

Correspondant OFB : PERCEVAL Olivier

Liste des personnes ayant participé à l'étude : BOTHAMY Angélique

Table des matières

1	Introduction.....	10
2	Contexte, problématique et objectifs de l'étude.....	10
2.1	Les perturbateurs endocriniens (EDCs).....	10
2.2	Identification et évaluation des EDCs dans la réglementation européenne.....	11
2.3	La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et les Normes de Qualité Environnementale (NQE, ou EQS) 12	
2.4	Les EDCs dans la DCE.....	13
3	Priorisation des substances d'intérêt.....	14
4	Étude de cas : évaluation du tébuconazole.....	18
4.1	Stratégie et méthode d'évaluation proposées par le guide ECHA/EFSA pour l'identification des EDCs.....	18
4.1.1	Collecte des informations et des preuves disponibles.....	19
4.1.2	Evaluation des preuves.....	20
4.1.3	Analyse initiale des preuves (choix des scenarii).....	23
4.1.4	Analyse de(s) mode(s) d'action(s) (MoA).....	25
4.2	Résultats de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.....	26
4.2.1	Collecte des informations et preuves disponibles.....	26
4.2.2	Evaluation des preuves.....	28
4.2.3	Analyse des preuves et orientation de l'évaluation.....	33
4.2.4	Analyse des Modes d'Action postulés.....	34
4.2.5	Conclusion sur le caractère ED du tébuconazole.....	37
4.3	Implications de l'évaluation du caractère ED pour l'EQS du tébuconazole.....	37
4.3.1	Raisonnement logique et présentation de l'EQS pré-existante.....	37
4.3.2	QS pour la protection des organismes aquatiques.....	38
4.3.3	QS pour la protection des prédateurs supérieurs.....	40
4.3.4	Analyse globale de l'EQS.....	41
5	Difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).....	42
6	Conclusions et perspectives.....	43
7	Références.....	44
8	Annexes.....	50
	Annexe 1 : Arbre de décision résumant toute l'évaluation pour l'identification des perturbateurs endocriniens selon le guide ECHA/EFSA (ECHA/EFSA, 2018).....	51
	Annexe 2 : Données de toxicité du tébuconazole. Lignes d'informations pour les données <i>in vitro</i> mécanistiques et les données <i>in vivo</i> sur organismes non cibles aquatiques et pour les mammifères. Résultats positifs et négatifs traduisant l'absence d'activité endocrine, ou l'activité endocrine ou des effets néfastes de types endocriniens.....	52

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Objectifs de protection environnementaux et sanitaires couverts par la méthodologie d'établissement de la NQE (TGD EQS, E.C., 2018).	12
Figure 2 : Résultats de la catégorisation avec le nombre de substances pour chaque catégorie (INERIS, 2018).	13
Figure 3 : Filtres utilisés pour la sélection des substances à étudier prioritairement. * PSEE : Polluant Spécifique de l'Etat Ecologique ; SPAS : Substances Pertinentes A Surveiller (cf. Arrêté du 27/7/18 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface)	15
Figure 4 : Schéma illustrant les différents critères à utiliser pour conclure sur l'identification d'une substance en tant que perturbateur endocrinien selon l'approche « trépied » du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).	19
Figure 5 : Critères dits « de Klimisch » définis en 1997 pour encadrer l'évaluation des données de toxicité et d'écotoxicité dans un contexte d'évaluation des dangers et des risques (Klimisch et al., 1997).	21
Figure 6 : Critères dits « CRED » définis en 2016 pour encadrer l'évaluation des données d'écotoxicité dans un contexte de détermination de valeurs seuils pour l'environnement (Moermond et al., 2016).	22
Figure 7 : Schéma récapitulatif des étapes d'évaluation et d'analyse initiale des preuves (ECHA/EFSA, 2018)	24
Figure 8 : Schéma illustrant les différents critères dits « de Bradford Hill » (Hill, 1965) à utiliser pour conclure sur le MoA d'une substance dans le cadre de l'approche « Weight of Evidence » selon le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).	25
Figure 9 : Schéma récapitulatif des résultats de l'analyse des preuves et le scénario obtenu pour l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.	33

Tableaux

Tableau 1 : Scores de priorisation (de 1, le plus prioritaire à 3, le moins prioritaire) de chacune des 8 substances présélectionnées pour la révision des valeurs seuils ; résultats des filtres appliqués pour la pré-sélection des 29 valeurs seuils françaises (statut réglementaire, occurrence, effets d'activité ou de perturbation endocrine sur les organismes aquatiques) et critères de priorisation appliqués a posteriori dans le jugement d'expert (usage et mise sur le marché, intérêt d'autres pays et développement éventuel d'AOP(s) pour le(s)quel(s) la substance a été identifiée comme un « facteur de stress »). ...	16
Tableau 2 : Groupement des paramètres pertinents pour l'identification de propriétés de perturbation endocrine d'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).	20
Tableau 3 : Tests standardisés les plus recommandés pour l'investigation de l'activité endocrine médiateur EATS (ECHA/EFSA, 2018)	24
Tableau 4 : Extrait du tableau rassemblant les informations utiles à l'évaluation des données (EA et effets néfastes) sur les organismes aquatiques. Certaines colonnes (ex : année de publication) ont été retirées pour augmenter la lisibilité. (Pour plus de détails, notamment expérimentaux, se reporter en Annexe 2)	27
Tableau 5 : MoA n°1 « inhibition de la stéroïdogenèse chez les mammifères par plusieurs événements clés, avec pour MIE une diminution de l'induction de la LH ». « (effet néfaste) » : effet considéré comme non prépondérant dans l'AOP en raison de son manque de répétabilité dans le pool de données du tébuconazole.	34
Tableau 6 : MoA n°2 « Antagonisme des récepteurs androgéniques (AR) avec pour MIE un modèle de prédiction ToxCast ». « (effet néfaste) » : effet considéré comme non prépondérant dans l'AOP en raison de son manque de répétabilité dans le pool de données du tébuconazole. « (KE 2) » : KE considéré comme incertain en raison d'une variation de l'effet dans le pool de données.	35
Tableau 7 : Normes de Qualité (QS) pour le tébuconazole telles que proposées par l'INERIS dans la fiche EQS (INERIS, 2011).	38
Tableau 8 : Données d'écotoxicité chronique aquatique sous-jacentes à l'établissement de la QS pour la protection des organismes aquatiques lors de la détermination de l'EQS pour le tébuconazole (INERIS, 2011).	38
Tableau 9 : Plus faibles concentrations sans effets reportés pour les organismes aquatiques lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.	39

Tableau 10 : Données de toxicité sur les mammifères et oiseaux sous-jacentes à l'établissement de la QS pour la protection des prédateurs supérieurs vis-à-vis de l'empoisonnement secondaire lors de la détermination de l'EQS pour le tébuconazole (INERIS, 2011).....	40
Tableau 11 : Plus faible concentration sans effets reportés pour les mammifères lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.	40

Résumé

Pour répondre aux objectifs de la Directive européenne Cadre sur l'Eau, l'Etat français a mis en place plusieurs actions figurant dans le plan Micropolluants 2016-2021 et dans la seconde Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE2). Certaines de ces actions ont pour but de mieux prendre en compte la perturbation endocrine (ED) des substances chimiques dans la construction des valeurs de référence, afin de mieux évaluer la qualité des masses d'eaux et apprécier les risques envers les organismes aquatiques et l'Homme.

L'état de l'art mené par l'INERIS en 2018 sur la prise en compte actuelle des propriétés d'activité ou de perturbation endocrine dans l'établissement des Normes de Qualité Environnementale (NQE ou EQS pour *Environmental Quality Standard*) avait permis de catégoriser les substances prioritaires pour une éventuelle mise à jour de leur valeur seuil. Le travail s'est poursuivi en 2019 avec une étude de cas, consistant en l'intégration du caractère ED d'une substance dans la construction de son EQS.

Pour cela, le guide d'identification des perturbateurs endocriniens (ECHA/EFSA, 2018) a été mis en œuvre sur une des 6 substances priorisées : le tébuconazole, une substance couramment utilisée en tant que fongicide. L'évaluation du caractère de perturbateur endocrinien du tébuconazole chez les organismes aquatiques et leurs prédateurs supérieurs (oiseaux et mammifères), s'est appuyée sur de nombreuses sources (bibliographie et modèles de prédiction) constituant plus de 200 lignes de preuves. Elle a permis de démontrer que le tébuconazole est un ED chez les mammifères et que les données actuelles conduisent à émettre de fortes suspicions sur les effets ED chez les organismes aquatiques, sans que la démonstration puisse être faite avec certitude dans l'application stricte du guide d'identification des perturbateurs endocriniens (ECHA/EFSA, 2018).

Cette étude de cas, menée sur le tébuconazole, a permis de prendre la mesure de l'ampleur du travail à évaluer réglementairement la potentialité de perturbation endocrine d'une substance selon le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018). Cet exercice a permis d'analyser la valeur ajoutée et l'impact de cette évaluation sur le raisonnement mené pour l'établissement de l'EQS. S'il est évident que l'évaluation du caractère ED du tébuconazole est un travail conséquent qui apporte une forte valeur ajoutée pour la complétude du jeu de données d'écotoxicité lors de l'établissement de l'EQS et de la compréhension de mécanismes d'action, l'étude de cas du tébuconazole nous démontre également que cet exercice ne mène pas forcément à l'abaissement de la valeur seuil, mais plutôt – dans une certaine mesure – à une amélioration de sa robustesse.

Abstract

To meet the goals of the Water Framework Directive, the French state has established several measures which appear in the 2016-2021 Micropollutant plan and in the second National Strategy on Endocrine Disruptors (SNPE). In order to better assess the quality of aquatic compartments, some of these measures aim to better consider the endocrine disrupting effects of chemicals during the establishment of water standards.

The state of the art led by INERIS in 2018 on how far and consistent are current Environmental Quality Standards (EQS) taking into account endocrine activity and disruption allowed to categorise substances for which an update is deemed of priority. In 2019 our reflexion work has progressed with the implication of ED properties assessment of a substance on its EQS derivation.

To this aim, the guidance for the identification of endocrine disruptors (ECHA/EFSA, 2018) was applied to one of the 6 chemicals previously prioritized: tebuconazole, a chemical currently used as a fungicide and biocide. This expertise to assess ED properties of tebuconazole for aquatic organisms and top predators (birds and mammals) is based on numerous sources (bibliographical and predictions) through more than 200 lines of evidence. It has demonstrated that tebuconazole is an EDC in mammals and that current data lead to strong suspicions about endocrine disrupting effects in wildlife, although the demonstration could not be made with certainty according to the guidance for the identification of EDCs (ECHA/EFSA, 2018).

This case study led on tebuconazole, allows us to estimate the worth of a assessing the ED potential of a chemical in the regulatory context according to the guidance for the identification of endocrine disruptors (ECHA/EFSA, 2018). The added value and impact of this assessment on the reasoning behind of the EQS was analysed. It is obvious that identifying a chemical as an ED according to the methodology recommended in this guidance is a tremendous work which provides a high added value for ecotoxicity dataset completeness when deriving the EQS and analysing the chemical mode of action. But this case study also further demonstrates that this undertaking does not necessarily lead to reducing the threshold but rather improves its robustness, to a certain extent.

Pour citer ce document :

Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, « Vers une meilleure prise en compte de la perturbation endocrine dans les normes de qualité environnementale – Phase II : application du guide européen d'identification des perturbateurs endocriniens pour les pesticides & biocides et implications pour l'établissement des valeurs seuils. Une étude de cas (tébuconazole) ». Verneuil-en-Halatte : Ineris - 181216 - 1994313 - v4.0, 11/02/2021.

Mots-clés :

Normes de Qualité Environnementale ; Perturbation Endocrine ; Méthodologie

Notes de contexte / glossaire, abréviations

Note 1 :

Les Valeurs Guides Environnementales (VGE) et les Normes de Qualité Environnementale (NQE) **sont issues de la même méthodologie**, celle du Guide Technique européen pour la détermination des NQE (Technical guidance document for deriving Environmental Quality Standards » ou TGD-EQS, E.C., 2018).

Les VGE sont des propositions faites par l'INERIS à l'Etat (Ministère en charge des questions d'environnement) pour être éventuellement reprises dans des textes législatifs. Elles deviennent alors des normes (NQE) à caractère réglementaire dans le contexte de la Directive Cadre sur l'Eau, ou DCE (2000/60/EC).

Nota Bene relative à la nomenclature et à l'utilisation des acronymes dans ce rapport :

Les Normes de Qualité Environnementale, communément abrégées « NQE » en langue française sont initialement nommées « Environmental Quality Standards » en langue anglaise, et abrégées « EQS ».

*Les Valeurs Guides Environnementales, sont abrégées « VGE » en langue française et ont pour particularité par rapport aux EQS de ne pas avoir de portée réglementaire (cf. ci-dessus), mais sont des valeurs seuils construites selon la même méthodologie scientifique que les EQS. **On utilisera donc également l'acronyme EQS pour désigner ces valeurs dans le présent rapport.***

*Les Perturbateurs Endocriniens, communément abrégés « PE » en langue française sont fréquemment nommé « Endocrine Disruptors » (ED) ou « Endocrine Disrupting Compounds » ou « Endocrine Disrupting Chemicals » (EDCs) en langue anglaise. On abrègera aussi EA l'« activité endocrine » des substances dont le potentiel de **perturbation** n'est pas démontré.*

Compte tenu de l'utilisation fréquente des acronymes dans le contexte réglementaire et les méthodologies qui y sont associées, et afin de trouver plus de cohérence avec le contenu des guides techniques européens, une préférence est donnée aux acronymes en langue anglaise.

Les acronymes EQS, EA, ED et EDCs seront donc utilisées tout au long de ce rapport (plutôt que leurs traductions en langue française NQE, PE, etc.)

Note 2 :

Le guide d'identification des Perturbateurs Endocriniens (ECHA/EFSA, 2018) a pour vocation à être utilisé dans un contexte d'évaluation de la dangerosité des produits phytopharmaceutiques et des biocides avant leur mise sur le marché. C'est pour cette raison que l'on retrouve le terme « organismes non-cibles » pour désigner les êtres vivants qui peuvent être affectés par une substance active qui n'est pas intentionnellement ciblée par le produit contenant la substance active en formulation. Cependant, dans le présent rapport, dans le contexte des Normes de Qualité Environnementale et de la Directive européenne Cadre sur l'Eau, seront préférés les termes d'« organismes aquatiques » pour désigner les algues, macrophytes et invertébrés aquatiques, poissons et amphibiens concernés par l'évaluation de la toxicité directe des substances, par opposition aux « oiseaux et mammifères » concernés par l'évaluation de la toxicité indirecte potentielle des substances sur les prédateurs supérieurs via l'empoisonnement secondaire (i.e. ingestion de proies contaminées).

Abréviations

AMA	: Amphibian Metamorphosis Assay
AOP	: Adverse Outcome Pathway
AR	: Androgen Receptor
CRED	: Criteria for Reporting Ecotoxicity Data
CoMPARA	: Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity
DHT	: Dihydrotestostérone
EA	: Endocrine Activity
ED	: Endocrine Distruption
EATS	: Estrogen Androgen Thyroid Steroidogenic
ECHA	: European Chemicals Agency
EDSP	: Endocrine Disruptor Screening Program
EFSA	: European Food Safety Agency
EQS	: Environmental Quality Standard
ER	: Estrogen Receptor
GD	: Gestationnal Day
GSI	: Gonado Somatic Index
HPG	: Hypothalamo Pituito Gonadique
KE	: Key Event
LAGDA	: Larval Amphibian Growth and Development Assay
MEORGT	: Medaka Extended One Generation Reproduction Test
MIE	: Molecular Initating Event
MoA	: Mode of Action
NOEC	: Non Observed Effect Concentration
NQE	: Norme de Qualité Environnementale
NMDR	: Non Monotonic Dose Response
OCDE	: Organisation pour le Commerce et le Développement
PE	: Perturbateur Endocrinien
PSEE	: Polluant Spécifique de l'Etat Ecologique
QS	: Quality Standard
SNPE	: Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriens
SPAS	: Substance Pertinente A Surveiller
TGD-EQS	: Technical Guidance Document for deriving Environmental Quality Standard
TSH β	: Thyroid Stimulating Hormone
US EPA	: United States Environmental Protection Agency
VGE	: Valeur Guide Environnementale
WoE	: Weight of Evidence
WHO/OMS	: World Health Organisation / Organisation Mondiale de la Santé
YES	: Yeast Estrogen Screening assay
YAS	: Yeast Androgenic Screening assay

1 Introduction

La Directive Cadre sur l'Eau (E.C., 2000) a pour objectif le maintien ou la restauration de la qualité des écosystèmes aquatiques. Pour lutter contre la pollution chimique, elle prévoit la mise en place de Normes de Qualité Environnementale (EQS), qui sont des valeurs seuils à ne pas dépasser dans l'eau, les sédiments ou le biote afin de protéger les écosystèmes aquatiques et la santé humaine d'une toxicité des substances présentes dans les milieux aquatiques. Ces normes existent pour plusieurs substances chimiques aussi diverses que des pesticides agricoles, biocides, substances chimiques industrielles ou des substances présentes dans les produits de consommation. Parmi elles, certaines substances capables de modifier les fonctions du système hormonal, dites « perturbateurs endocriniens » (EDCs), font l'objet d'une préoccupation particulière. En réponse à cette préoccupation, le TGD-EQS (E.C., 2018), bien que peu prescriptif dans ses recommandations quant à la considération des propriétés de perturbation endocrine des substances, indique que cette préoccupation doit être considérée dans la détermination des NQE. Par ailleurs, le plan micropolluants 2016-2021 (MEEM, 2016), qui poursuit notamment l'objectif de « consolider les connaissances pour adapter la lutte contre la pollution des eaux et préserver la biodiversité » (objectif n°2), recommande d'entreprendre une action afin de « *construire des valeurs de référence et des méthodologies pour mieux juger de la qualité des eaux de surface et souterraines prenant en compte les perturbateurs endocriniens et les métabolites* » (action n°34). Le contenu de cette action est également repris dans la deuxième Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (MTES/MSS, 2019) qui souhaite « *Mieux prendre en compte le caractère PE dans la construction des normes de qualité environnementale (NQE) et des valeurs guides environnementales (VGE) pour des substances chimiques à enjeux pour les milieux aquatiques* » (action n° 25).

En 2018, un état des lieux de la prise en compte du potentiel ED lors de la détermination des valeurs seuils existantes établies dans le cadre de la DCE a été réalisé. Ce travail a permis, premièrement d'alerter sur le manque d'harmonisation dans la prise en compte du caractère ED lors de l'établissement des EQS, et deuxièmement de catégoriser les substances étudiées en 3 grands groupes pour lesquels de premières recommandations ont été émises concernant la nécessité de mettre à jour les EQS (INERIS, 2018).

Ces premiers travaux ont suscité le développement de travaux méthodologiques, débutant par la mise en œuvre de cas pratiques avant de pouvoir faire des préconisations d'ordre plus générique. Ainsi, l'objectif de la présente étude consiste à réaliser une étude de cas avec (i) un examen fin des données (mode d'action notamment) *via* la mise en œuvre du guide d'identification des perturbateurs endocriniens (ECHA/EFSA, 2018) et (ii) une étude des implications possibles de la prise en compte de ces données et leur analyse dans la détermination de l'EQS, l'objectif étant *in fine* de faire des propositions méthodologiques nouvelles, plus prescriptives, pour la prise en compte du caractère ED des substances dans l'établissement des EQS.

2 Contexte, problématique et objectifs de l'étude

2.1 Les perturbateurs endocriniens (EDCs)

Le système endocrinien regroupe tous les organes qui sécrètent des hormones, ceux-ci ayant pour objectif de contrôler les principales fonctions du corps : reproduction, croissance, développement, métabolisme et même immunité (Milla et al., 2011). Depuis quelques décennies, une préoccupation grandissante est portée aux substances capables de modifier les fonctions du système endocrinien en raison de leurs impacts potentiels. Ces substances sont communément appelées « perturbateurs endocriniens » (EDCs).

Une des premières définitions de ces substances a été proposée par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US EPA), qui qualifie de perturbateur endocrinien « un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles endogènes du corps qui sont responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation de processus de développement » (Kavlock et al., 1996).

Cependant, celle de l'OMS, datant de 2002, a été jusqu'en 2017 la définition la plus communément admise. Celle-ci mentionne en outre l'impact populationnel ainsi que les effets transgénérationnels. En effet, pour l'OMS, un perturbateur endocrinien est une « substance exogène ou un mélange qui altère la ou les fonctions du système endocrinien et, par voie de conséquence, cause un effet délétère sur la santé d'un individu, sa descendance ou des sous-populations » (WHO, 2002).

Les EDCs sont connus pour avoir des modes d'actions variés et des effets tout aussi variables. En effet, comme il a été mentionné dans la définition de l'US-EPA, les EDCs peuvent interférer avec la liaison de l'hormone à son récepteur en se fixant sur le même site de liaison pour entraîner par la suite une réponse agoniste ou antagoniste, notamment par modification de la conformation tridimensionnelle du récepteur en question (Le Maire et al., 2010).

Bien que l'Agence Européenne de la Sécurité des Aliments (European Food Safety Agency, EFSA) ait proposé en 2013 de distinguer les Substances Actives sur le Système Endocrinien (SASE), pouvant interagir ou interférer avec l'activité hormonale *in vitro* sans conséquences néfastes *in vivo*, des perturbateurs endocriniens ayant de réels effets néfastes *in vivo*, la problématique reste complexe et le lien de cause à effets entre une activité endocrine et un effet néfaste reste difficile à mettre en évidence. L'étude des voies de toxicité, dite AOP (*Adverse Outcome Pathway*), reliant les effets aux différentes échelles d'organisation biologique permet d'aider à la mise en évidence de ce lien de cause à effet entre un mode d'action de type endocrine et des effets néfastes sur les individus et les populations

La difficulté d'établir ce lien est notamment due à des courbes dose-réponse non linéaires (ou non monotones, NMDR), à l'existence d'effets à (très) faibles doses, à la problématique des fenêtres d'exposition (les organismes sont plus sensibles dans certaines périodes de leur cycle de vie : période foetale, périnatale, et pubertaire), à la latence d'apparition des effets, ainsi qu'aux possibles effets trans-générationnels. Ces caractéristiques font des EDCs des substances pour lesquelles la détermination d'effets « à seuils de dose » est controversée au sein de la communauté scientifique.

La compréhension de tous les mécanismes d'action des EDCs, encore incomplète aujourd'hui, rend ainsi complexe l'établissement de normes et réglementations les concernant.

2.2 Identification et évaluation des EDCs dans la réglementation européenne

Le potentiel ED des substances chimiques a commencé à faire l'objet de préoccupations dans l'Union Européenne à partir de 1999. Une stratégie communautaire s'est donc mise en place, qui a pour objectif d'apporter des éclaircissements sur la perturbation endocrine en général. Dans un premier temps, tout en poursuivant l'identification des lacunes en termes de connaissances, la Commission Européenne a établi une liste de substances pour lesquelles une action prioritaire pourrait être requise au regard de leurs propriétés ED. La première liste a été établie en 2004 (E.C., 2004) et a été mise à jour en 2007 (E.C., 2007), puis en 2011 (E.C., 2011). Cette liste est issue de travaux réalisés par des organismes mandatés par la Commission Européenne. Les travaux scientifiques les plus récents sous-jacents à la stratégie communautaire dans ce domaine sont ceux issus des travaux de DHI Water & Environment en 2007 (Petersen *et al.*, 2007), qui a complété par les substances chimiques produites à faible tonnage la liste des substances identifiées comme prioritaires au regard de leur potentiel de perturbation endocrine déjà établie en 2000 (Groshart et Okkerman, 2000). Ce rapport plus récent identifie par ailleurs séparément les évaluations menées pour la santé humaine et l'environnement.

En parallèle de cela, l'OCDE a mis en place des tests standardisés et lignes directrices pour mieux caractériser le caractère ED des substances évaluées, le but étant de réussir à associer science et réglementation pour arriver à réduire, voire maîtriser les risques posés par les perturbateurs endocriniens, aussi bien pour la faune sauvage que pour l'Homme. Bien que la prise de conscience du danger des EDCs date maintenant de plusieurs décennies, l'état des connaissances scientifiques, puis les difficultés méthodologiques et les divergences entre les parties prenantes, ont retardé les décisions de l'Europe et la mise en place de réglementations.

En septembre 2017 et avril 2018, la Commission Européenne a consécutivement publié le règlement 2017/2100/CE « définissant des critères scientifiques pour la détermination des propriétés perturbant le système endocrinien, conformément au règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil » et le règlement 2018/605/CE « modifiant l'annexe II du règlement (CE) no 1107/2009 en établissant des critères scientifiques pour la détermination des propriétés perturbant le système endocrinien ».

C'est en juin 2018 que l'Agence Européenne des Produits Chimiques (European CHemicals Agency, ECHA), chargée de l'examen des substances actives biocides, et l'EFSA, chargée de l'examen des substances actives de pesticides agricoles, ont conjointement publié un guide pour l'identification des perturbateurs endocriniens dans le cadre des deux règlements correspondants. Ce guide est dénommé ci-après dans ce rapport « guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018) ». La méthodologie proposée dans ce guide pour l'identification est exposée et synthétisée en section

4.1 Stratégie et méthode d'évaluation proposées par le guide ECHA/EFSA pour l'identification des EDCs.

2.3 La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et les Normes de Qualité Environnementale (NQE, ou EQS)

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE, C.E., 2000), adoptée le 23 octobre 2000, structure la politique communautaire des états membres de l'UE dans le domaine de l'eau. La DCE a pour objectifs l'amélioration ou le maintien de la qualité du milieu (atteinte du bon état des masses d'eau et non accumulation des polluants dans les sédiments et le vivant) et la réduction des émissions et élimination des substances dangereuses prioritaires. Afin que ses objectifs soient atteints, la DCE a mis en place des objectifs de qualité à respecter et des programmes de surveillance visant à atteindre un bon état chimique et écologique. En parallèle, elle met en place des programmes de mesure afin de réduire celles des substances dites « substances prioritaires » et de supprimer les émissions de substances considérées comme « substances dangereuses prioritaires ».

Le bon état chimique est respecté lorsque la concentration d'une substance prioritaire ou d'un groupe de substances prioritaires ne dépasse pas une valeur seuil, appelée Norme de Qualité Environnementale (NQE), ou « *Environmental Quality Standard* » en anglais (EQS).

Cette valeur seuil couvre 5 objectifs de protection présentés dans la Figure 1 ci-dessous : la protection des communautés pélagiques (eau douce et eau marine), la protection des communautés benthiques (vivant sur ou dans les sédiments), la protection des prédateurs supérieurs vis-à-vis de l'empoisonnement secondaire, et enfin la protection de la santé humaine *via* la consommation des produits de pêche d'une part et l'eau de boisson d'autre part (TGD EQS, E.C., 2018). Une norme de qualité, ou *Quality Standard* en anglais (QS), est déterminée pour chacun de ces objectifs de protection.

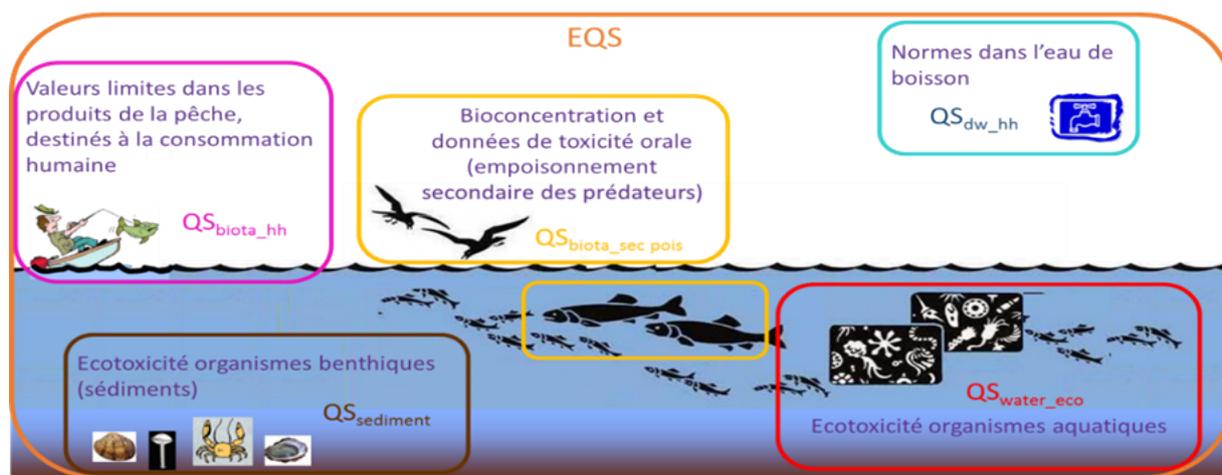


Figure 1 : Objectifs de protection environnementaux et sanitaires couverts par la méthodologie d'établissement de la NQE (TGD EQS, E.C., 2018).

L'EQS correspondant à une substance donnée sera obtenue à partir des QS calculées pour chaque compartiment (si elles sont disponibles). Dans l'objectif de protéger la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et des compartiments qui y sont liés (prédateurs supérieurs et santé humaine), on s'attache à protéger le compartiment correspondant à l'espèce la plus sensible. L'EQS, est donc retenue comme étant la plus faible des 5 valeurs de QS.

La démarche complète de détermination de l'EQS suit un cadre méthodologique précis qui est établi par le Document Guide Technique européen pour la détermination des EQS (« *Technical guidance document for deriving Environmental Quality Standards* », E.C., 2018), ci-après dénommé TGD EQS.

Dans le cadre du présent rapport, il est à retenir que la construction des QS est en général basée sur la division de la plus faible concentration sans effets validée du jeu de données (bien souvent EC₁₀, ou NOEC lorsque la première n'est pas disponible), par un facteur d'extrapolation dont la vocation est de tenir compte au mieux des incertitudes résiduelles liées à la variabilité des données disponibles et

potentielles (inter- et intra-laboratoire, inter- et intra-espèces) et de l'extrapolation liée à l'établissement de cette valeur (extrapolation a minima des données disponibles à l'environnement réel, mais également potentiellement extrapolation de données de court terme à une valeur seuil valable sur le long terme et extrapolation sur les effets connus de la substance mais potentiellement non pris en compte par le jeu de données effectivement disponibles).

La prise en compte d'une potentielle activité ou perturbation endocrine peut être effective en plusieurs endroits lors de la construction de cette valeur. C'est ce que nous nous proposons notamment d'étudier avec l'étude de cas réalisée sur le tébuconazole (cf. section 4.3 Implications de l'évaluation du caractère ED pour l'EQS du tébuconazole).

2.4 Les EDCs dans la DCE

Le TGD EQS n'est pas prescriptif dans ses recommandations quant à la considération des propriétés de perturbation endocrine des substances. Par conséquent, la prise en compte du caractère ED des substances peut être assez hétérogène selon les substances étudiées. Pour évaluer cette hétérogénéité, une démarche d'analyse et de catégorisation a donc été menée par l'INERIS en 2018 sur un univers de 189 substances ayant des valeurs seuils françaises ou européennes et possédant chacune un document dédié permettant de justifier précisément de la construction de l'EQS.

Cette catégorisation a permis de mettre en évidence 3 groupes de substances pour lesquelles de premières recommandations ont été émises concernant la nécessité de mettre à jour en priorité les EQS. Il s'agit de la catégorie 1, qui correspond aux substances pour lesquelles le caractère ED n'a pas été pris en compte. Elle est subdivisée en 3 sous-catégories selon que l'identification du caractère ED a été notifiée ou non, et selon les sources de cette identification (listes européennes ou littérature scientifique). La catégorie 2 correspond aux substances pour lesquelles le caractère ED a été pris en compte de manière « adéquate » mais où l'argumentaire de la fiche exposant la valeur seuil serait à revoir. La catégorie 3 correspond aux substances pour lesquelles le caractère ED a été pris en compte et argumenté de manière « adéquate ». Enfin, la catégorie 4 correspond aux substances pour lesquelles aucun caractère ED n'a été identifié à ce stade (INERIS, 2018).

La Figure 2 ci-dessous illustre les étapes ayant mené à la catégorisation des substances.

La catégorie 1, qui comprend 60 substances, apparaît comme la plus prioritaire pour une révision de l'EQS au vu de la faible considération du potentiel ED.

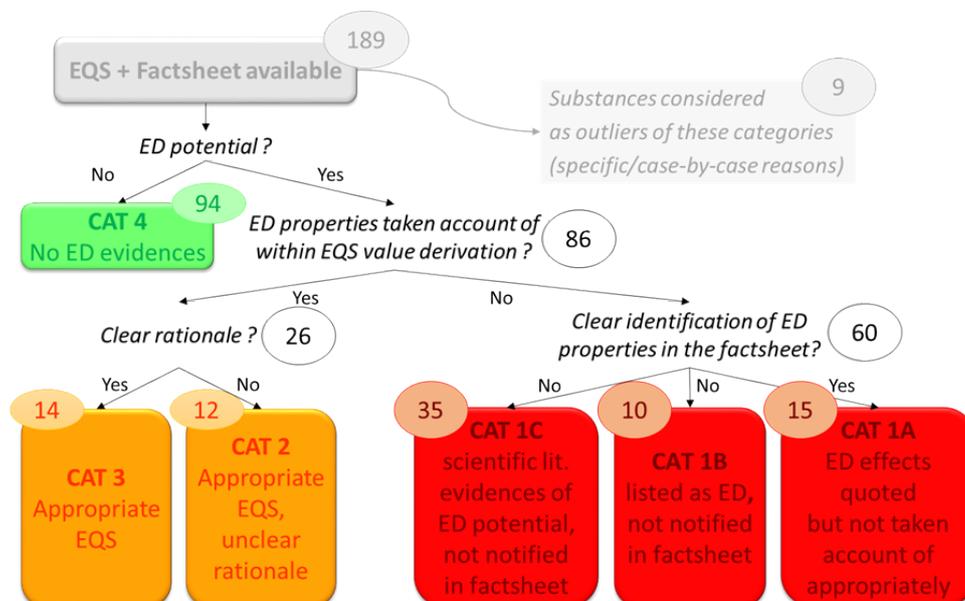


Figure 2 : Résultats de la catégorisation avec le nombre de substances pour chaque catégorie (INERIS, 2018).

3 Priorisation des substances d'intérêt

Afin de prioriser le travail à réaliser sur 2019, les substances de la catégorie 1 pour lesquelles il existe des données disponibles quant à un potentiel ED sur les organismes vivants, mais peu ou mal pris en compte dans la détermination de l'EQS, ont logiquement été considérées comme d'intérêt prioritaire (59 substances). Ensuite, seules celles pour lesquelles des valeurs seuils ont été établies au niveau national ont été conservées (29 substances). Parmi elles, les substances incluses dans le programme français de surveillance de l'état des eaux de chaque bassin hydrographique dans le cadre de la DCE (Polluants Spécifiques de l'Etat Ecologique (PSEE) et Substances Pertinentes A Surveiller (SPAS)) ont été priorisées (10 substances).

Associé à ces investigations, un examen des données d'occurrence a été effectué grâce à la base de données Naïades (www.naiades.eaufrance.fr) qui a mis en évidence le peu de pertinence à retenir la terbutylazine, a priori peu quantifiée dans les eaux douces de surface françaises, restreignant la liste des substances priorisées à 9.

Enfin, les preuves d'effets potentiellement liés à une perturbation endocrine sur les organismes aquatiques et la santé humaine ont également été priorisées. Pour chacune des 9 substances retenues, il existait des preuves d'activité endocrine relatives à la santé humaine (données mammifères). Ces données seront utiles à l'évaluation des lignes de preuves dans une approche globale de la perturbation endocrine et pour la prise en compte de l'évaluation de l'empoisonnement secondaire. En revanche, en ce qui concerne les données sur les organismes aquatiques, les recherches sur le chlorophénol-4 n'ont pas permis de retenir des effets d'activité ou de perturbation endocrine. L'application de ce dernier filtre sur les effets a donc permis de retenir 8 substances : l'acétochlore, l'arsenic, la carbamazépine, le diclofénac sodium, le glyphosate, la pendiméthaline, le tébuconazole et le triclosan.

Pour affiner la priorisation, trois critères supplémentaires ont été examinés et ont fait l'objet d'un jugement d'expert pour prioriser un nombre encore plus restreint de substances, avec un score allant de 1 (le plus prioritaire) à 3 (le moins prioritaire). Ainsi, les substances dont l'usage est interdit ont été écartées et un score de 3 leur a été attribué : l'acétochlore, la pendiméthaline et le triclosan. En outre, un poids plus important a été donné aux substances qui sont des PSEE pour d'autres états européens (Etats Membres européens et Suisse), et aux substances présentant déjà des informations relatives aux « voies de l'effet néfaste », autrement appelées AOP (*Adverse Outcome Pathways*). En effet, le concept d'AOP fournit de précieuses informations permettant d'analyser précisément le déroulement du mode d'action (MoA) toxique de la substance et son lien avec des effets observables à l'échelle des individus (croissance, développement, reproduction, morphologie, etc.) ou des populations. Les AOP permettent d'assembler les connaissances sur le lien entre un événement moléculaire initiateur (MIE) comme une interaction entre une substance chimique et un récepteur, et un effet néfaste (Ankley *et al.*, 2010). Ils seront donc très utiles pour étudier précisément le MoA d'une substance et éventuellement savoir si elle possède ou non des propriétés de perturbation endocrine. Par défaut, un score de 2 a été attribué à l'arsenic et au glyphosate en raison de leur manquement à ce dernier critère. Pour finir, ce travail de priorisation a donc permis d'obtenir une liste restreinte à 3 substances sur lesquelles il est jugé prioritaire de travailler : le tébuconazole, la carbamazépine et le diclofénac.

Un récapitulatif de cette sélection est représenté *via* (i) l'application des filtres successifs schématisée en Figure 3 et (ii) l'application des critères associés pour la priorisation finale renseignée dans le Tableau 1.

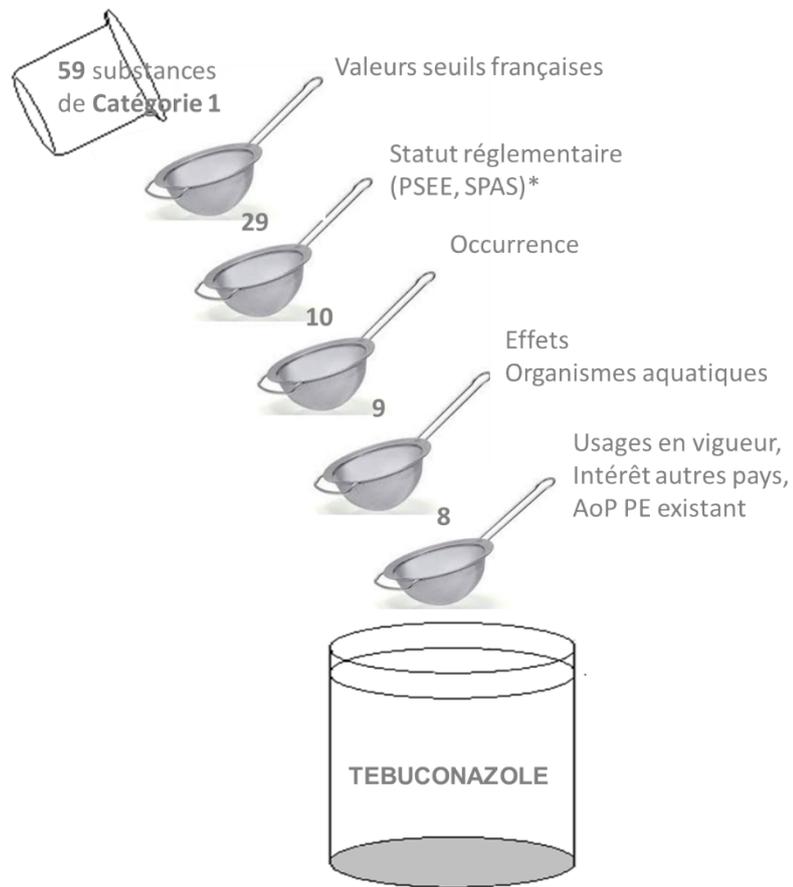


Figure 3 : Filtres utilisés pour la sélection des substances à étudier prioritairement. * PSEE : Polluant Spécifique de l'Etat Ecologique ; SPAS : Substances Pertinentes A Surveiller (cf. Arrêté du 27/7/18 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface)

Tableau 1 : Scores de priorisation (de 1, le plus prioritaire à 3, le moins prioritaire) de chacune des 8 substances présélectionnées pour la révision des valeurs seuils ; résultats des filtres appliqués pour la pré-sélection des 29 valeurs seuils françaises (statut réglementaire, occurrence, effets d'activité ou de perturbation endocrine sur les organismes aquatiques) et critères de priorisation appliqués a posteriori dans le jugement d'expert (usage et mise sur le marché, intérêt d'autres pays et développement éventuel d'AOP(s) pour le(s)quel(s) la substance a été identifiée comme un « facteur de stress »).

Category	Substance name + CAS number	EQS source	Leg. Status	Occurrence	Endocrine Activity on WL (adverse effects or MoA)	Use	Nb of countries	Countries	AOP	Priority score for revision
1A	Acetochlore 34256-82-1	INERIS 2014	SPAS water	Not investigated	Endocrine Activity Effects: DVP Thyroid disruptor Species: Fish Ref: Yang M et al., 2016	Pesticide WITHDRAWN	1	FR	No	3
1C	Arsenic 7440-38-2	INERIS 2015	RBSP	Relevant	Endocrine activity Effects : DVP (metamorphosis) Thyroid disruptor Species : Amphibians Ref : Davey et al. 2008	Metal	4	DE, DK, FR, SE	No	2
1C	Carbamazepine 298-46-4	INERIS 2012	SPAS water	Relevant	Endocrine activity Effects : GRO (molt, els), REP (ova-testis) AR antagonist, JH analog Species : Fish, crustaceans Ref: Oropesa et al., 2016 Saihong Yan et al., 2017	Pharmaceutical	4	DE, CH, FR, NL	Under dvp	1
1C	Diclofenac sodium 15307-86-5	INERIS 2015	SPAS water	Relevant	Endocrine activity Effects : REP (mating and reproductive success) ER agonist Species : Amphibians Ref : Efosa NJ et al., 2017	Pharmaceutical	2	CH, FR	Under dvp	1

Category	Substance name + CAS number	EQS source	Leg. Status	Occurrence	Endocrine Activity on WL (adverse effects or MoA)	Use	Nb of countries	Countries	AOP	Priority score for revision
1C	Glyphosate 1071-83-6	INERIS 2014	RBSP	Relevant	Endocrine activity Effects : REP (azoospermia, oocytes deformation) AR antagonist + ER antagonist Species : Snails Ref : Omran et al., 2013	Pesticide Approved (2022)	3	BE, CH, FR	No	2
1C	Pendimethaline 40487-42-1	INERIS 2015	RBSP	May become relevant	Possibly ED Effects : REP (intersex) ER agonist + AR antagonist Species : Fish Ref : Ngamniyom et al., 2012	Pesticide Approved (2024)	1	FR	No	3
1C	Tebuconazole 107534-96-3	INERIS 2011	RBSP	Relevant	Endocrine activity Effects : REP (fecundity), GRO Thyroid disruptor + AR (ant)agonist + ER antagonist (high dose only) Species : Fish, amphibians Ref : Poulsen et al., 2015 Sancho et al., 2016 Yu et al., 2013	Pesticide Approved (2020)	3	CH, DE, FR	Under dvp (ED MoA)	1
1C	Triclosan 3380-34-5	INERIS 2012	SPAS water	Relevant	Endocrine activity Effects: DVP (metamorphosis), GRO, REP (sperm count) Thyr disruptor + AR antagonist Species: Fish, amphibians Ref: Helbing CC et al., 2011, Veldhoen N et al., 2006 Schnitzler JG et al., 2016	Biocide NOT Approved (PT01, 02, 07, 09)	3	CH, DE, FR	No	3

4 Étude de cas : évaluation du tébuconazole

À la suite de la priorisation décrite ci-avant, le tébuconazole a été choisi comme première substance à expertiser, devant la carbamazépine et le diclofénac, au regard de la quantité de données sur son potentiel d'activité endocrine et du développement en cours d'un AOP sur l'inhibition de l'enzyme CYP7b qui catalyse notamment la synthèse de stéroïdes¹. En effet, comme d'autres fongicides, cette substance a pour mode d'action l'inhibition de la déméthylase impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol, lipide essentiel à la formation de la membrane des champignons (Kwok et Loeffler, 1993). L'ergostérol est un lipide chimiquement très proche du cholestérol (Bagiński *et al.*, 1989). Cette similarité sera un élément important lors de l'interprétation du mode d'action du tébuconazole sur la physiologie et le système endocrinien animal.

En outre, le tébuconazole présente une grande persistance dans les milieux aquatiques (dissipation de systèmes eau-sédiments : DT₅₀ de 54,4 jours pour des expérimentations en microcosmes en Allemagne et de 1 an et plus dans des expérimentations menées aux Pays-Bas, EFSA, 2007). Enfin, le tébuconazole est une substance active triazolée utilisée à la fois en tant que fongicide et biocide et qui a fait l'objet de plusieurs études et programmes de recherche (US-EPA, Danish-EPA) pour apporter des preuves quant à son caractère perturbateur endocrinien. Ces informations en faisaient donc une substance de choix pour la mise en application du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).

4.1 Stratégie et méthode d'évaluation proposées par le guide ECHA/EFSA pour l'identification des EDCs

Le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018) décrit comment collecter, évaluer et considérer toutes les informations pertinentes pour l'évaluation du mode d'action des substances (MoA) et comment appliquer une approche de type « Weight of Evidence » (WoE), ou « poids / faisceau de la preuve », ceci pour établir si oui ou non les critères permettant d'identifier la substance comme un EDC sont remplis. L'accent est mis sur les modes d'action de type « EATS », c'est-à-dire Estrogénique, Androgénique, Thyroïdien et relatifs à la Stéroïdogénèse. Pour l'instant, les tests OCDE se basent essentiellement sur ces modalités. Mais les paramètres non-EATS peuvent également être utilisés pour savoir si une substance remplit certains critères ED, notamment quand on a des données qui font le lien entre les mécanismes d'action endocrinien et effets adverses (par exemple des données d'histopathologie du pancréas endocrine).

Ces critères ED, définis dans le cadre de la réglementation européenne, vont dans le même sens que la définition préalablement donnée par l'OMS, tout en mettant l'accent sur une évaluation en **3 temps** : **(i)** investigation de preuve(s) d'induction d'**effet(s) néfaste(s)** chez un organisme intact ou sa descendance, **(ii)** investigation de **mode(s) d'action endocrinien(s)** (MoA EA) et **(iii) établissement d'un lien entre le MoA ED et l'effet néfaste observé**. A des fins de simplification, cette « évaluation en 3 temps » sera dénommée ci-après « trépied » dans le présent rapport. Ces critères, présentés dans la Figure 4, constituent l'ossature du raisonnement à suivre lors de l'évaluation et de la conclusion sur le caractère ED des substances, dictées par les règlements 2017/2100/CE et 2018/605/CE précités relatifs à la mise sur le marché des substances biocides et pesticides. La dernière étape d'établissement du lien entre le MoA endocrinien et l'effet néfaste reste l'étape la plus complexe. Pour arriver à une conclusion non ambiguë sur les critères ED d'une substance, il faut passer par plusieurs étapes prenant en compte de nombreux paramètres.

¹ <https://aopwiki.org/events/1386>

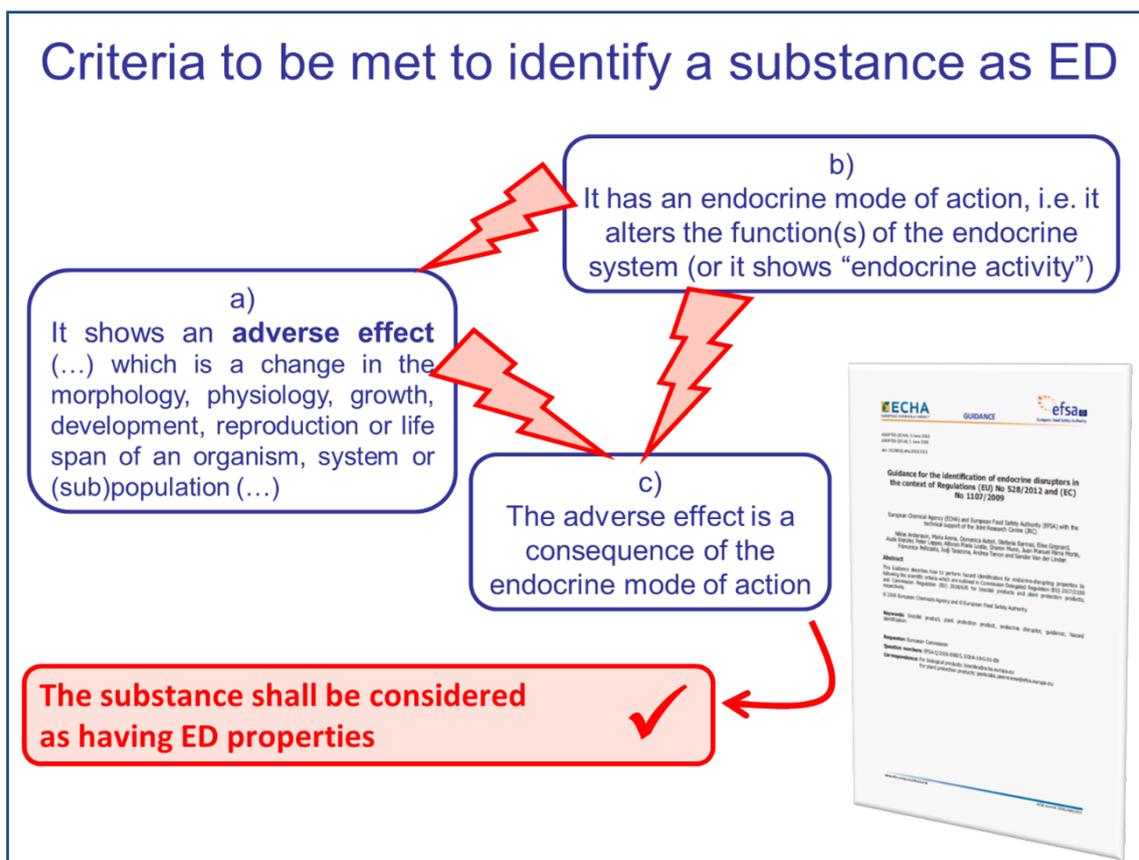


Figure 4 : Schéma illustrant les différents critères à utiliser pour conclure sur l'identification d'une substance en tant que perturbateur endocrinien selon l'approche « trépied » du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).

4.1.1 Collecte des informations et des preuves disponibles

La première étape de l'investigation consiste à rassembler toutes les données scientifiques pertinentes, issues de tests standardisés (OCDE, ISO, NF) ou non, provenant des bases de données bibliographiques classiquement investiguées (ScienceDirect, Google Scholar, Toxnet, Pubmed...) ou produites par des instituts et agences sanitaires et/ou environnementales participant à l'évaluation de la dangerosité des substances chimiques (INERIS et ANSES en France, UBA en Allemagne, EAWAG en Suisse, RIVM aux Pays Bas, Environment Agency du Royaume-Uni, de la Suède ou du Danemark, etc.). D'autres informations pourront être moissonnées dans des bases de données plus spécifiques dédiées aux perturbateurs endocriniens (par exemple la base de données de l'US EPA qui a développé un programme de screening des perturbateurs endocriniens (EDSP), utilisant les approches ToxCast (Toxicity Forecasting) qui peuvent être des données issues de batteries de tests *in vitro* ou de modèles prédictifs).

L'analyse des données devant suivre une approche WoE, l'accent est mis sur la nécessité de répertorier les données issues de tous types d'études pour les considérer ensemble, que ce soient des études de laboratoire standardisées ou non, *in vivo* ou *in vitro*, des données épidémiologiques, de modélisation de populations, des données prédictives de type « Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) ou ToxCast, ou encore des prédictions issues d'une approche par catégorie (« *read-across* »)². Il est également précisé que les résultats dits « négatifs », c'est-à-dire démontrant l'absence d'effets d'une substance aux concentrations testées, doivent être inventoriés. Dans cette approche WoE, un poids potentiellement différent sera donné à chacune de ces études suivant les conclusions de l'étape d'évaluation des preuves.

² Acquisition de nouvelles données à partir de l'analyse de données déjà existantes sur des substances chimiques proches.

4.1.2 Evaluation des preuves

4.1.2.1 Groupement des paramètres

Les paramètres collectés peuvent être associés à des groupes, ou catégories, distinctes, ainsi dénommé(e)s dans le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018): « *in vitro* mechanistic », « *in vivo* mechanistic », « EATS-mediated », et enfin « sensitive to, but not diagnostic of EATS ».

Ces groupes de paramètres sont explicités dans le Tableau 2 avec une définition et un exemple pouvant s'appliquer, par exemple, au poisson zèbre.

Tableau 2 : Groupement des paramètres pertinents pour l'identification de propriétés de perturbation endocrine d'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).

Groupes de paramètres	Définition	Exemples pour le poisson zèbre
Preuves <i>in vitro</i> mécanistes	Preuve fournissant des informations sur l'activité endocrine de la substance	Augmentation de la transcription du gène Dio2
Preuves <i>in vivo</i> mécanistes	Preuve fournissant des informations sur l'activité endocrine de la substance mais sans effets néfastes reportés	Diminution de la vitellogénine plasmatique chez les femelles
Preuves d'effet(s) néfaste(s) médié(s) EATS	Paramètres mesurés <i>in vivo</i> qui fournissent des informations sur les effets néfastes <i>via</i> un MoA de type EATS	Inversion significative du sex ratio en faveur des mâles
Preuve de sensibilité à un(des) paramètre(s) EATS, mais sans diagnostic sur un MoA EATS	Paramètres mesurés <i>in vivo</i> , contribuant à l'évaluation des effets néfastes, mais sans apporter un diagnostic selon un MoA de type EATS	Réduction significative du nombre d'œufs et de leur fécondation

4.1.2.2 Revue systématique

D'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), chaque donnée doit faire l'objet d'une évaluation rigoureuse de type « *systematic review* », ou revue systématique, c'est-à-dire qu'il est nécessaire de **systematiquement résumer, évaluer et analyser les études qui répondent à une question spécifiquement relative à l'activité endocrine de la substance**.

Une fois collectées, ces données devront faire l'objet d'une évaluation rigoureuse de leur pertinence et de leur fiabilité. Ces deux critères sont fondamentaux pour pouvoir établir par la suite une conclusion juste et conforme sur la substance concernée.

La **pertinence** permettra de déterminer dans quelle mesure les données et/ou les tests sont appropriés pour une identification des dangers ou une caractérisation des risques particulière, alors que la **fiabilité** permettra d'évaluer la qualité inhérente d'un test ou d'une étude par rapport à une méthodologie standardisée et à la manière dont l'expérimentation et ses résultats sont décrits pour démontrer la clarté et la plausibilité des résultats.

Ces deux paramètres peuvent communément être évalués selon plusieurs approches qui ont été largement décrites et discutées dans la communauté des experts en évaluation des risques (Ågerstrand *et al.*, 2011; Durda et Preziosi, 2000; ECHA, 2012; Hobbs *et al.*, 2005; Klimisch *et al.*, 1997; Kuster *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2016; Moermond *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2009; Segal *et al.*, 2015).

Le premier d'entre eux, communiqué au travers d'une publication scientifique en 1997 et très utilisé en évaluation réglementaire des dangers en Europe est l'« approche systématique pour l'évaluation de la qualité des données expérimentales de toxicité et d'écotoxicité » dans un contexte d'évaluation des dangers et des risques, autrement appelé « **critères de Klimisch** » (Klimisch *et al.*, 1997). Cette approche aborde l'évaluation de la fiabilité, de la pertinence et de l'adéquation des données et précise l'étape d'évaluation de la fiabilité en définissant 4 catégories qualificatives, évaluées principalement au regard des lignes directrices standardisées de l'OCDE : donnée fiable, donnée fiable avec restrictions, donnée non fiable, donnée non évaluable. Ces critères sont reportés dans l'encart ci-dessous (Figure 5).

A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data ¹	
H.-J. KLIMISCH, ² M. ANDREAE, AND U. TILLMANN	
BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen, Germany	
REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY 25 , 1–5 (1997)	
Code	Category
1	Reliable without restriction
2	Reliable with restrictions
3	Not reliable
4	Not assignable

Figure 5 : Critères dits « de Klimisch » définis en 1997 pour encadrer l'évaluation des données de toxicité et d'écotoxicité dans un contexte d'évaluation des dangers et des risques (Klimisch et al., 1997).

Un manque de prescriptions précises pour l'attribution des critères a été reproché à cette approche. Aussi, d'autres publications ont plus tard proposé que le schéma d'évaluation des données soit mieux encadré, notamment par l'établissement d'un score ou d'une catégorie en réponse à une liste précise de questions. Certaines abordent parfois plus spécifiquement l'évaluation des données d'écotoxicité (Durda et Preziosi, 2000 ; Hobbs *et al.*, 2005 ; Moermond *et al.*, 2016) ou de toxicité sur mammifères (Schneider *et al.*, 2009 ; Vermeire *et al.*, 2013), quand d'autres schémas portent plus spécifiquement sur certaines catégories de substances chimiques (par exemples les substances d'usage pharmaceutique : Ågerstrand *et al.*, 2011; Kuster *et al.*, 2009). L'une de ces approches (Schneider *et al.*, 2009) a été déclinée sous la forme d'un logiciel « **ToxRTool** ». Ce logiciel, développé dans le cadre d'un projet financé par la Commission Européenne³, distingue l'évaluation des données *in vivo* des données *in vitro* et s'inspire toujours indirectement des critères de classification établis par Klimisch. Il existe, enfin, des études comparatives des systèmes d'évaluation existants (Lynch *et al.*, 2016 ; Segal *et al.*, 2015).

Parmi les approches disponibles les plus récentes, il en est une que le TGD EQS (E.C., 2018) recommande explicitement d'utiliser. Il s'agit des « **Critères pour le rapportage et l'évaluation des données d'écotoxicité** » (« **Criteria For Reporting and Evaluating Ecotoxicity Data** », **CRED**). Cette approche, a été établie par des experts évaluateurs des risques des Pays-Bas, de la Suisse et de la Suède dans l'objectif d'encadrer l'évaluation des données d'écotoxicité lors de la détermination de valeurs seuils pour l'environnement, par exemple des concentrations prédites sans effets pour l'environnement (PNEC) ou des normes de qualité environnementale (Moermond *et al.*, 2016). Elle est une standardisation, variante très détaillée inspirée des critères de Klimisch. Elle permet, comme la précédente, de guider l'évaluateur sur la manière d'aborder les points clés à vérifier dans une étude. Elle comporte 20 critères de fiabilité et 13 critères de pertinence. De ce fait, ses auteurs précisent qu'elle apporte plus de précisions, de cohérence et de transparence dans l'évaluation des données d'écotoxicité. Dans le même temps, cette méthode a également pour inconvénient d'être fastidieuse à mettre en œuvre. Les critères de cette approche sont reportés dans l'encart ci-après (Figure 6).

³ Portage ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods of the European Commission's Joint Research Centre, Ispra, Italy)

Hazard/Risk Assessment

CRED: CRITERIA FOR REPORTING AND EVALUATING ECOTOXICITY DATA

CAROLINE T.A. MOERMOND,*† ROBERT KASE,‡ MURIS KORKARIC,§ and MARLENE ÅGERSTRAND||

†Centre for Safety of Substances and Products, National Institute for Public Health and the Environment RIVM, Bilthoven, The Netherlands

‡Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Dübendorf, Switzerland

§Department of Environmental Toxicology, EAWAG, Dübendorf, Switzerland

||Department of Environmental Science and Analytical Chemistry, Stockholm University, Stockholm, Sweden

(Submitted 5 June 2015; Returned for Revision 1 September 2015; Accepted 18 September 2015)

Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 35, No. 5, pp. 1297–1309, 2016

Table 2. CRED reliability criteria^a

Number	Criterion
General information	
	Before evaluating the test, check the physicochemical characteristics of your compound (handbooks/general sources). What is the solubility, log K_{OW} , or pK_a ? Is the compound volatile? Does it hydrolyze, photolyze, etc.?
Test setup	
1	Is a guideline method (e.g., OECD/ISO) or modified guideline used? ^b
2	Is the test performed under GLP conditions? ^b
3	If applicable, are validity criteria fulfilled (e.g., control survival, growth)?
4	Are appropriate controls performed (e.g., solvent control, negative and positive control)?
Test compound	
5	Is the test substance identified with name or CAS number? Are test results reported for the appropriate compound?
6	Is the purity of the test substance reported? Or, is the source of the test substance trustworthy?
7	If a formulation is used or if impurities are present: Do, other ingredients in the formulation exert an effect? Is the amount of test substance in the formulation known?
Test organism	
8	Are the organisms well described (e.g., scientific name, weight, length, growth, age/life stage, strain/clone, gender if appropriate)?
9	Are the test organisms from a trustworthy source and acclimatized to test conditions? Have the organisms not been pre-exposed to test compound or other unintended stressors?
Exposure conditions	
10	Is the experimental system appropriate for the test substance, taking into account its physicochemical characteristics?
11	Is the experimental system appropriate for the test organism (e.g., choice of medium or test water, feeding, water characteristics, temperature, light/dark conditions, pH, oxygen content)? Have conditions been stable during the test?
12	Were exposure concentrations below the limit of water solubility (taking the use of a solvent into account)? If a solvent is used, is the solvent within the appropriate range and is a solvent control included?
13	Is correct spacing between exposure concentrations applied?
14	Is the exposure duration defined?
15	Are chemical analyses adequate to verify concentrations of the test substance over the duration of the study?
16	Is the biomass loading of the organisms in the test system within the appropriate range (e.g., < 1 g/L)?
Statistical design and biological response	
17	Is a sufficient number of replicates used? Is a sufficient number of organisms per replicate used for all controls and test concentrations?
18	Are appropriate statistical methods used?
19	Is a concentration–response curve observed? Is the response statistically significant?
20	Are sufficient data available to check the calculation of endpoints and (if applicable) validity criteria (e.g., control data, concentration–response curves)?

^aSee main text for further explanation of the criteria and explanatory guidance text on how to interpret the criteria. Please note that most criteria are not per se critical for the reliability of a study and that this depends strongly on the compound and/or species tested.

^bThese criteria are of minor importance for study reliability but may support study evaluation.

CRED = criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data; ISO = International Organization for Standardization; GLP = good laboratory practice; CAS = Chemical Abstracts Service; K_{OW} = octanol–water partition coefficient; OECD = Organisation for Economic Co-operation and Development; pK_a = dissociation constant.

Figure 6 : Critères dits « CRED » définis en 2016 pour encadrer l'évaluation des données d'écotoxicité dans un contexte de détermination de valeurs seuils pour l'environnement (Moermond et al., 2016).

Après avoir évalué l'ensemble des études selon les outils disponibles et jugés pertinents, les preuves sont recueillies selon une approche holistique, en partant du principe qu'il existe une bonne conservation du fonctionnement du système endocrinien entre les taxons, notamment chez les vertébrés (Denver *et al.*, 2009; Le Roith *et al.*, 1980), et que les preuves recueillies sur chacun des taxons peuvent servir à l'analyse des autres taxons.

L'évaluation de ces preuves passe par un raisonnement logique, c'est-à-dire qu'elles doivent être potentiellement utiles à l'établissement du caractère EA et ED de la substance.

C'est dans le cadre de la détermination des critères ED, que l'on utilisera la définition de la survenue d'effets néfastes donnée par l'OMS en 2009, à savoir : « Tout ce qui se matérialisera par un changement dans la morphologie, physiologie, croissance, développement, reproduction ou dans l'espérance de vie de l'organisme, du système ou de la (sous) population, résultant en une déficience des capacités fonctionnelles, de compensation des stress additionnels, ou en une augmentation de la susceptibilité à d'autres influences ou effets ».

Il est admis que la survenue d'effets néfastes peut n'être représentée que par un seul paramètre (ex : histopathologie des testicules ou diminution de la fertilité), mais ne doit pas se restreindre à un seul individu pour les organismes « non cibles », c'est-à-dire que la représentativité populationnelle est nécessaire à l'évaluation des effets ED chez les organismes non mammifères. Les changements comportementaux observés, ou par exemple l'altération des capacités à faire face aux stress, qui impactent finalement la population, doivent donc être considérés comme des effets néfastes. L'échelle populationnelle peut aussi servir dans l'approche WoE lorsque d'autres paramètres comme la répétabilité des effets, sont manquants. Par ailleurs, lors de l'évaluation en général, il est impératif d'exclure les effets néfastes qui ne sont pas dus aux effets de perturbation endocrine induits par la substance. C'est pour cela qu'il est important que la dose maximum tolérée (MTD) soit renseignée pour chaque substance, l'objectif étant d'avoir le moins de toxicité systémique directe au cours de l'étude considérée.

Cette évaluation doit également être basée sur la notion du « support empirique ». Le support empirique est représenté par la concordance temporelle des effets (c'est-à-dire qu'il faut un certain ordre entre les événements clés, une suite logique possible), les paramètres de dose-réponse associés aux effets (même non monotone) et la cohérence entre les études et les espèces, surtout pour les effets de variations hormonales. Les courbes doses-réponse non-monotones (NMDR) seront à prendre en considération seulement lorsque le nombre de concentrations testées sera suffisamment élevé (Lagarde *et al.*, 2015).

4.1.3 Analyse initiale des preuves (choix des scenarii)

Une fois les lignes de preuves extraites, rassemblées, évaluées, plusieurs scenarii sont envisageables en fonction des données disponibles. L'arbre de décision du schéma de la Figure 7, issu du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), renseigne sur les différentes questions qui doivent être posées pour poursuivre, ou non, l'évaluation.

Si des preuves de survenue d'effets néfastes EATS sont observées et retenues, alors l'étape d'analyse du ou des MoA connus est nécessaire. Ce sont les scenarii 1b et 2b.

Si aucune preuve de survenue d'effets néfastes EATS n'est observée ou retenue mais qu'une activité endocrine est observée, c'est le scénario 2a(i), qui mène également à l'analyse du ou des MoA connus.

Si aucune preuve de survenue d'effets néfastes EATS n'est observée ou retenue et qu'aucune activité endocrine n'est observée – bien que suffisamment recherchée, c'est le scénario 2a(ii), qui mène à la conclusion qu'aucun critère ED ne peut être rempli (trépied obligatoire).

Si aucune preuve de survenue d'effets néfastes EATS n'est observée ou retenue et qu'aucune activité endocrine n'est observée, mais que cette dernière n'a pas été suffisamment recherchée, c'est le scénario 2a(iii), qui mène à un retour à l'étape de collecte d'informations.

Lorsqu'aucune preuve probante de survenue d'effets néfastes n'est retenue sur les paramètres EATS, on conclut qu'aucun critère ED ne peut être rempli (trépied obligatoire). C'est le scénario 1a. Cette conclusion est également atteinte lorsqu'aucune preuve probante de survenue d'effets néfastes n'est retenue sur les paramètres EATS et qu'une activité endocrine a été démontrée mais que celle-ci n'a pas été suffisamment recherchée (après passage réitéré à l'étape de collecte d'informations).

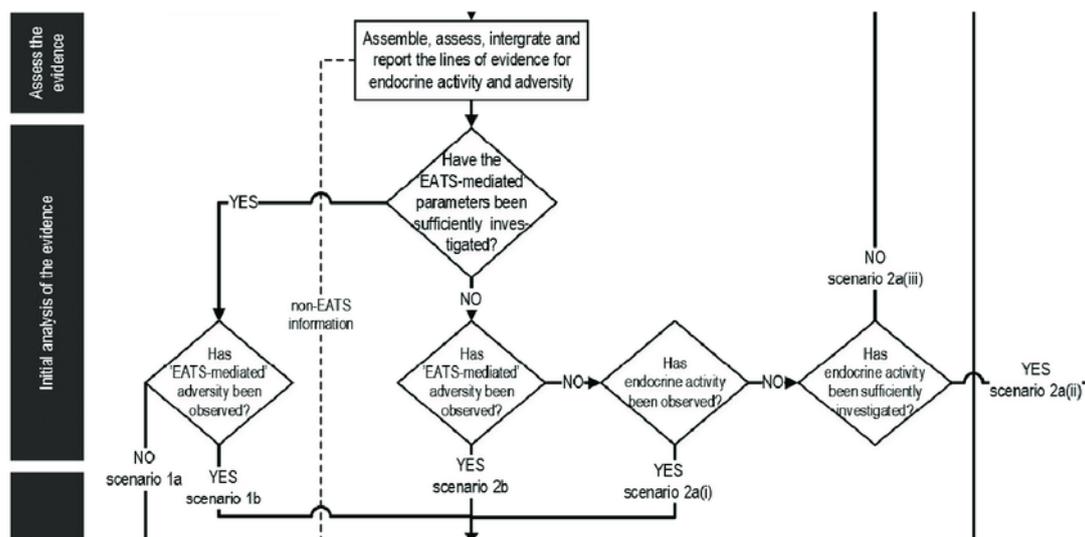


Figure 7 : Schéma récapitulatif des étapes d'évaluation et d'analyse initiale des preuves (ECHA/EFSA, 2018)

Afin de répondre à ces questions, il est nécessaire d'analyser le type de tests représentés par les données regroupées dans les lignes de preuves.

D'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), l'investigation de l'effet EATS est conditionnée par la disponibilité de données issues de tests standardisés de l'OCDE, parmi lesquels, par exemple, des tests de reprotoxicité pour les rats sur une génération (EOGRTS⁴, OCDE, 2018) ou deux générations (OECD TG 416, OCDE, 2001), pour le médaka sur une génération (MEORGT⁵, OCDE, 2015b) et pour les amphibiens, données de tests larvaires sur amphibien de type LAGDA⁶ (OCDE, 2015a) ou AMA⁷ (OCDE, 2009a). De la même manière, l'investigation de l'activité endocrine requiert la disponibilité de données issues de tests standardisés. Les plus recommandés figurent dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tests standardisés les plus recommandés pour l'investigation de l'activité endocrine médiée EATS (ECHA/EFSA, 2018)

EATS evidence	Pathway	OECD CF Level	Assay family	OECD guideline	Other guidelines	Other sources of data
EATS activity	Estrogen	Level 2	Transactivation assay	OECD TG 455	OPPTS 890.1300	ToxCast ER Bioactivity Model
		Level 3		OECD TG 440 OECD TG 229		
	Androgen	Level 2	Transactivation assay	OECD TG 458		
		Level 3		OECD TG 441		
		Level 3		OECD TG 229		
	Steroidogenesis	Level 2	Steroidogenesis	OECD TG 456	OPPTS 890.1550; EU B.57	
		Level 3	CYP19	OECD TG 229	OPPTS 890.1200	
Thyroid	Level 3		OECD TG 231			

⁴ EOGRTS : Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (OECD TG 443, OCDE, 2018)

⁵ MEOGRT: Medaka extended one-generation reproduction test (OECD TG 240, OCDE, 2015b)

⁶ LAGDA: Larval amphibian growth & development assay (OECD TG 241, OCDE, 2015a)

⁷ AMA: Amphibian Metamorphosis Assay (OECD TG 231, OCDE, 2009a)

4.1.4 Analyse de(s) mode(s) d'action(s) (MoA)

Cette étape, qui précède la conclusion sur le MoA, doit être réalisée pour tous les scénarii sauf 1a et 2a(ii) (cf. Figure 7) où il y a eu suffisamment de recherche sur la substance concernée pour conclure directement sur l'absence d'activité/d'effets néfastes de type endocrine et donc l'absence de critères EA et ED. Pour les autres scénarii, cette étape va servir à décrire une série d'évènements biologiques appelés « Key Event » (KE) ou « évènements clefs » qui vont résulter en un effet néfaste spécifique. Il existe des KE précoces, qui fournissent des informations sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la substance et sont appelés « Molecular Initiating Event » (MIE) ou « évènements moléculaires initiateurs ». Il existe également des KE tardifs, qui apportent des informations sur un organe, un organisme (individu) et éventuellement sur la population.

Pour conclure sur le lien biologique plausible entre effets néfastes et activité endocrine, il ne sera pas nécessaire de devoir faire le lien entre tous les KE et l'effet néfaste. Il suffit que le lien soit établi une seule fois entre les données d'endocrinologie et d'(éco)toxicologie, pour conclure à une propriété de « perturbation endocrine » du MoA.

Il est possible de décrire plusieurs MoA, mais les investigations doivent s'orienter vers le MoA où les lignes de preuves les plus convaincantes sont disponibles. Si plusieurs effets néfastes ne pouvant pas être expliqués par le même MoA sont observés chez le même organisme, alors chaque effet néfaste doit être analysé séparément pour différencier chaque MoA.

Dans le cadre de l'approche WoE, des informations supplémentaires doivent être apportées pour confirmer le MoA établi. Il s'agit des critères dits « de Bradford Hill » (Hill, 1965), représentés ci-après dans le schéma de la Figure 8. Ces critères de causalité, utilisés historiquement surtout en épidémiologie, ont été adaptés spécifiquement pour l'évaluation du caractère ED des substances chimiques dans le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018). Il s'agit de démontrer autant que faire se peut (i) la plausibilité biologique du lien de causalité entre EA et effets néfastes, c'est-à-dire le degré de compréhension et de documentation des processus biologiques impliqués, (ii) la cohérence des données, c'est-à-dire la répétabilité des KE entre différentes études, espèces, systèmes, etc., (iii) l'analogie, c'est-à-dire la possibilité d'observer les mêmes KE pour des substances pour lesquelles le même MoA a été établi et d'aborder enfin (iv) la spécificité, c'est-à-dire la preuve d'un lien exclusif entre le MoA endocrinien connu et les effets néfastes reportés.

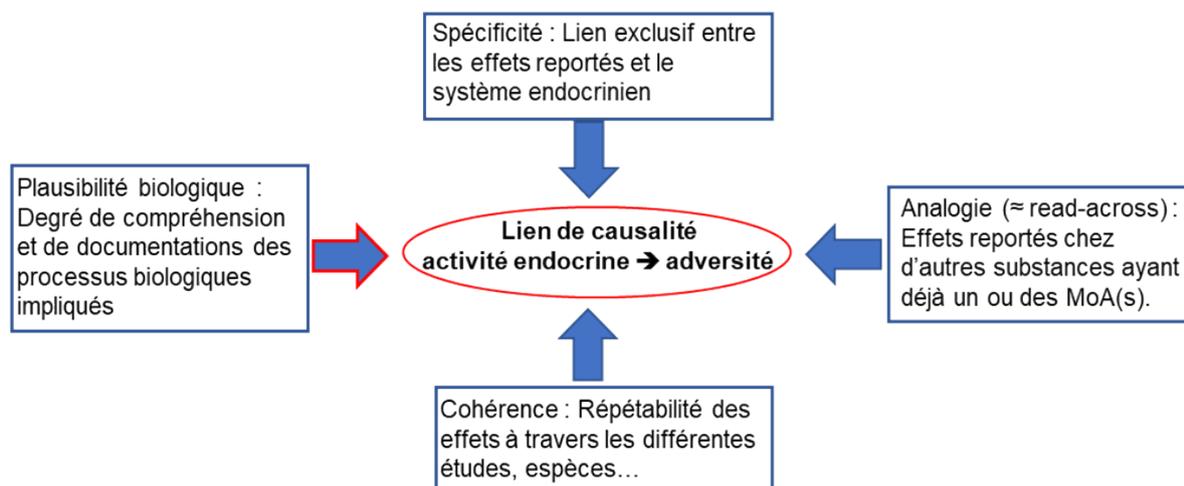


Figure 8 : Schéma illustrant les différents critères dits « de Bradford Hill » (Hill, 1965) à utiliser pour conclure sur le MoA d'une substance dans le cadre de l'approche « Weight of Evidence » selon le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018).

4.2 Résultats de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole

4.2.1 Collecte des informations et preuves disponibles

Parmi les données de la littérature, sont disponibles des rapports institutionnels d'évaluations comme celui de l'Agence de Protection de l'Environnement du Danemark (Danish-EPA) sur les effets des composés azolés sur les fonctions hormonales sexuelles et thyroïdiennes (Kjærstad *et al.*, 2007), ainsi que des rapports de l'US EPA dans le cadre de son programme EDSP (epa.gov). Ces rapports et revues compilent plusieurs études déjà retrouvées dans les bases de données classiques de la littérature et contiennent en outre des données non publiées de fabricants (ex : Banman *et al.*, 2012, pour Bayer CropScience), utilisant des tests standardisés, apportant par conséquent du poids dans l'interprétation de l'ensemble des données collectées pour la mise en œuvre de l'approche WoE. Enfin, la base de données dédiée aux AOPs (aopwiki.org) a permis l'identification d'un MIE très pertinent pour le tébuconazole. Il s'agit de l'inhibition de l'enzyme stéroïde-7 α -hydroxylase codé par le gène CYP7B (Yantsevich *et al.*, 2014). Cet événement est un élément essentiel pour l'interprétation des lignes de preuves et donc à la compréhension du MoA du tébuconazole.

Conformément au guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), toutes les données, mise à part l'ébauche d'AOP, sont répertoriées dans un tableau sur la base de celui fourni en annexe E du guide, chaque ligne d'information correspondant à un effet (résultat positif) ou à une absence d'effet (résultat négatif). Un extrait de ce tableau rassemblant les informations nécessaires à l'évaluation des effets sur les organismes aquatiques est présenté à titre d'exemple ci-après (Tableau 4).

Au total, ce sont 213 lignes d'informations qui ont été collectées, constituées aussi bien d'effets positifs que négatifs. Une étude peut apporter plusieurs lignes d'information pertinentes.

Concernant les données sur les organismes aquatiques, 5 espèces sont représentées, à travers 72 lignes d'information dont une partie est présentée dans le Tableau 4. Plus précisément, les données sur les organismes aquatiques regroupent : un poisson téléostéen (*Danio rerio*), deux amphibiens (*Xenopus laevis* et *Hyla intermedia*) et deux espèces d'invertébrés (*Daphnia magna* et *Attheyella crassa*). **Les données sur invertébrés, bien que non abordées spécifiquement dans le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), ont été intégrées dans les étapes d'évaluation.**

Aucune donnée n'a été collectée sur les oiseaux, prédateurs supérieurs potentiels des maillons de la chaîne trophique aquatique.

Les données sur mammifères, basées uniquement sur des modèles biologiques murins (rats, souris), représentent une grande partie des informations collectées, avec 110 lignes d'information pour les données *in vivo*. Les données *in vitro*, qui ont permis d'obtenir des informations sur le MoA cellulaire et/ou moléculaire de la substance, sont regroupées en 31 lignes d'information. Ces dernières sont issues d'études utilisant parfois des tests standardisés, notamment le test de stéroïdogenèse sur lignée cellulaire H295R (Kjærstad *et al.*, 2010; OCDE, 2011), ou d'autres tests classiques comme les tests de liaison au récepteur aux androgènes AR (Roelofs *et al.*, 2014).

Il est à noter que la base de données ToxCast a permis de reporter 18 lignes d'information, dont 2 provenant de modèles prédictifs. Ces modèles compilent eux-mêmes plusieurs tests ToxCast pour arriver à un seul modèle intégrant l'activité biologique de la substance et éliminant les effets de cytotoxicité éventuelle (Mansouri *et al.*, 2016). Pour le tébuconazole, seul deux modalités EATS possèdent un modèle prédictif associé : la modalité estrogénique (Browne *et al.*, 2015; Kamel *et al.*, 2017) et la modalité androgénique (Kleinstreuer *et al.*, 2018). Ces modèles constituent une alternative possible aux tests *in vivo* permettant d'accompagner l'évaluation car ils combinent une grande quantité d'informations sur les propriétés physico-chimiques de la substance, son activité biologique et ses propriétés biochimiques, notamment en utilisant le criblage à haut débit (HTS pour « *High Throughput Screening* ») qui est une automatisation de tests *in vitro* (Shukla *et al.*, 2010).

Tableau 4 : Extrait du tableau rassemblant les informations utiles à l'évaluation des données (EA et effets néfastes) sur les organismes aquatiques. Certaines colonnes (ex : année de publication) ont été retirées pour augmenter la lisibilité. (Pour plus de détails, notamment expérimentaux, se reporter en Annexe 2)

Species	Doses tested	Dose unit	Route of administration	Exposure	Exposure unit	Generation /Life stage	Additional remarks	Relevance	Reliability	In vivo mechanistic	In vivo mechanistic	EATS-mediated	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Systemic toxicity (amphibian)					
Danio rerio	0, 1, 2, 4	mg/L water	Uptake from water	120	Hours	Larval	Significantly change was only	Yes	Yes	Increase 4 (Significantly change)									
Danio rerio	230	other	Uptake from water	7	Days	Adult	Only one dose of tebuconaz	Yes	Yes		Increase 230 (Significant)								
Danio rerio	230	other	Uptake from water	14	Days	Adult	Only one dose of tebuconaz	Yes	Yes		Increase 230 (Significant)								
Danio rerio	0.05, 0.20, 0.50	mg/L water	Uptake from water	60	Days	Offspring (F1)	The heart rate was significant	Yes	Yes				Decrease 0.05 (Change in)		Increase 0.05 (Change in)		Decrease 0.05 (Change in)		
Danio rerio	0.05, 0.20, 0.50	mg/L water	Uptake from water	60	Days	Adult (F0)	The level of T4 was significant	Yes	Yes	Decrease 0.50 (Statistical)									
Danio rerio	0.05, 0.20, 0.50	mg/L water	Uptake from water	60	Days	Eggs	Here, egg=embryos.	Yes	Yes	No effect N/A (N/A, Absolute)									
Danio rerio	0.05, 0.20, 0.50	mg/L water	Uptake from water	60	Days	Larval	Significantly reduced T4 level	Yes	Yes	Decrease 0.50 (Statistical)									
Hyla intermedia	5, 50	other	Uptake from water	78	Days	Tadpole	Before of day 60, survival	Yes	Yes			Increase 5 (Significant change)	Increase 5 (Animals were)		Increase N/A (Effects on)				Increase 5 (significantly greater)
Hyla intermedia	5, 50	other	Uptake from water	49	Days	Tadpole	The exposition lasted for	Yes	Yes								No effect N/A (Exposure)		
Hyla intermedia	5, 50	other	Uptake from water	46	Days	Tadpole	Exposure to tebuconaz	Yes	Yes										
Xenopus laevis	0, 0.1, 1, 10, 100, 500	other	Uptake from water	12	Days	Adult	No NOEC or LOEC can be	Yes	Yes										

4.2.2 Evaluation des preuves

Dans le cadre de cette étude de cas sur le tébuconazole, les méthodes d'évaluation de la qualité des données à disposition citées précédemment dans ce rapport (cf. section 4.1.2.2 Revue systématique) ont été utilisées pour l'évaluation des preuves. De nombreuses lignes d'information ont été considérées fiables et pertinentes. Elles ont ensuite été assemblées dans les différentes catégories de preuves définies par le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018) (*in vitro* mécanistes, *in vivo* mécanistes, effets EATS, effets contribuant à l'évaluation de la survenue d'effets néfastes mais sans conclusion sur un MoA de type EATS, cf. 4.1.2.1 Groupement des paramètres) pour pouvoir ensuite être interprétées.

Selon les recommandations du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), les effets pour lesquels le « support empirique » est insuffisant ont été exclus et les effets relatifs à l'activité endocrine ont été séparés des effets néfastes.

De cette étape, il résulte l'inventaire non-exhaustif des preuves listées ci-après qui serviront à toutes les étapes de l'évaluation. (Pour plus de détails, notamment expérimentaux, se reporter en Annexe 2).

4.2.2.1 Preuves d'activité endocrine

4.2.2.1.1 Preuves EA *in vitro* mécanistes

Kjaerstad <i>et al.</i> , 2010, test H295R	<ul style="list-style-type: none">• Inhibition de l'activation du récepteur AR en présence de testostérone dans des cellules ovariennes.	} <i>Cricetulus griseus</i> (Hamster)
	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à l'œstradiol (test de prolifération de cellules cancéreuses hormono-dépendantes).	
	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à la testostérone.	} Homme
	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la synthèse de testostérone dans la lignée cellulaire H295R.	
	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la synthèse d'œstradiol dans la lignée cellulaire H295R.	
	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation de la synthèse de progestérone dans la lignée cellulaire H295R.	

- *in vitro* mécanistes (suite)

Roelofs <i>et al.</i> , 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la synthèse de testostérone seule et de la testostérone induite directement par la LH dans la lignée cellulaire MA-10 (cancer testiculaire). • Aucun effet sur l'expression des gènes StAR (transport du cholestérol), CYP11A1, CYP17A1, 3β-HSD1 et 17β-HSD3 (tous impliqués dans la stéroïdogénèse) dans la lignée cellulaire MA-10 • Diminution de l'activation du récepteur AR en présence de testostérone dans la lignée cellulaire T47D-ARE (cellules cancéreuses hormono-dépendantes), exprimant un élément de réponse aux androgènes : ARE = « Androgen Response Element » (Blankvoort <i>et al.</i>, 2001) 	Souris
Orton <i>et al.</i> , 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'activation du récepteur AR dans la lignée cellulaire MDA-kb2 (cellules cancéreuses) exprimant un élément de réponse aux androgènes (Wilson VS <i>et al.</i>, 2002) en utilisant la dihydrotestostérone (DHT) comme agoniste naturel pour évaluer l'effet antagoniste de la substance. 	
Yantsevich <i>et al.</i> , 2014 (AOP event)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'activité CYP7B (stéroïde-7α-hydroxylase) par fixation sur son site catalytique 	
ToxCast	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de liaison et d'activité agoniste, antagoniste sur les récepteurs aux œstrogènes d'après les modèles de prédictions ToxCast (basé sur les données d'AUC ou « aire sous la courbe ») et d'après le projet CERAPP (Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project) qui combine de nombreux modèles et notamment des approches QSAR (Mansouri <i>et al.</i>, 2016) issus de plusieurs organismes, dont l'US-EPA. • Antagonisme du récepteur aux androgènes (AR) d'après les modèles de prédiction ToxCast et d'après le projet CoMPARA (Collaborative Modelling Project for Androgen Receptor Activity) (Mansouri <i>et al.</i>, 2017) • Antagonisme du récepteur TRα dans la lignée cellulaire hypophysaire GH3. • Inhibition de l'expression du gène CYP19A1, codant l'aromatase dans la lignée cellulaire MCF-7 	Homme

4.2.2.1.2 Preuves EA in vivo mécanistes

Yu <i>et al.</i> , 2013	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des niveaux d'hormones T3 et T4 chez les larves 	}	Poisson zèbre
Li <i>et al.</i> , 2019	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des niveaux de T3 et T4 chez les femelles adultes • Diminution des niveaux de T4 chez les mâles adultes • Diminution des niveaux de T4 chez les embryons et larves après exposition des parents 		
Taxvig <i>et al.</i> , 2007, test Hershberger	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des niveaux de 17α-hydroxyprogestérone (intermédiaire de synthèse des stéroïdes) et de testostérone testiculaire fœtale (GD 21) après exposition des femelles gestantes. • Augmentation du niveau de progestérone testiculaire fœtale (GD21) après exposition des femelles gestantes. • Diminution du niveau de T3 chez les femelles gestantes. • Diminution de l'expression du gène de l'ornithine décarboxylase prostatique chez le mâle adulte (ce gène est sous le contrôle d'hormones, notamment la LH (Kobayashi <i>et al.</i>, 1971). 	}	Rat
Yang <i>et al.</i> , 2018	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité d'enzymes de détoxification de phase I : EROD, MCO, ECOD, PROD dans le foie de jeunes mâles et femelles • Diminution de l'activité de ces enzymes dans les testicules de jeunes mâles. • Augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes superoxyde dismutase dans les testicules de jeunes mâles et femelles. • Diminution du niveau de testostérone sérique de jeunes mâles. 		
Joshi <i>et al.</i> , 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du niveau de testostérone sérique chez les mâles adultes. • Diminution des niveaux de FSH et LH sériques chez les mâles adultes. 		

4.2.2.2 Preuves de survenue d'effets néfastes liée à une activité endocrine, médiées EATS

Bernabò <i>et al.</i> , 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du succès à la métamorphose. • Augmentation du temps de métamorphose. 	Amphibien (rainette)
Moser <i>et al.</i> , 2001	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du poids de l'épididyme chez les mâles adultes. • Diminution du poids de l'utérus vide chez les femelles adultes. 	Rat
Yang <i>et al.</i> , 2018	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme chez les mâles adultes. • Pas d'effet sur le poids des organes reproducteurs mâles. 	
Joshi <i>et al.</i> , 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du poids de plusieurs organes reproducteurs mâles (testicules, épидидyme, vésicules séminales, prostate). • Diminution de la densité spermatique testiculaire et de l'épididyme chez les mâles adultes. • Anomalies de motilité des spermatozoïdes de l'épididyme chez les mâles adultes. • Dégénérescence des cellules épithéliales germinales testiculaires chez les mâles adultes. 	
Sancho <i>et al.</i> , 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du nombre d'individus par portée par femelle. • Augmentation de la durée de gestation des femelles. 	

4.2.2.3 Preuves contribuant à l'évaluation de la survenue d'effets néfastes, mais sans conclusion sur un MoA de type EATS

Taxvig <i>et al.</i> , 2007	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la durée de gestation des femelles. • Augmentation du taux de mortalité péri-natal et post-implantatoire. 	} Rat
Moser <i>et al.</i> , 2001	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du nombre de lymphocytes CD4+ et CD8+ chez les mâles. • Diminution des capacités d'apprentissage et troubles du comportements de la génération F1 après exposition des femelles adultes. • Absence d'effets sur la mémoire chez les 2 générations. • Absence d'effet sur la fertilité des femelles. • Diminution du nombre d'individus par portée après exposition des femelles gestante. 	
Sancho <i>et al.</i> , 2016	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la taille des individus F1 après exposition des femelles F0. • Diminution de la taille du corps des mâles et femelles adultes F0. 	} Daphnie
Turesson <i>et al.</i> , 2007	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la taille des larves après exposition des mâles et femelles F0. • Diminution du nombre de descendants F1 après exposition des mâles et femelles F0. 	} Copépode (<i>Atheyella Crassa</i>)
Banman <i>et al.</i> , 2012, test AMA	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de longueur museau-narine et de la longueur des membres postérieurs chez les adultes. • Absence d'effets sur la survie des larves. 	} Amphibien (Xénope)
Banman <i>et al.</i> , 2012, test FSTRA	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'index GSI (poids des gonades) mâles et femelles. • Diminution du taux de vitélogénine plasmatique chez les femelles. 	} Méné (<i>Pimephales promelas</i>)

La très grande majorité des preuves listées ci-dessus n'est pas issue de tests standardisés. Les explications ci-dessous décrivent une partie de l'évaluation des résultats, avec un focus sur les critères donnant lieu à l'exclusion de certaines publications.

Par exemple, le test Hershberger sur rats (OCDE, 2009b) a été mis en œuvre dans une seule publication (Taxvig, 2007). Ce test permet la détection de l'activité (anti)androgénique de la substance d'intérêt, notamment par des mesures du poids des organes reproducteurs. Bien que cette publication soit considérée « fiable sans restriction », les résultats seront à interpréter dans un contexte plus large, en intégrant d'autres données non issues de tests standardisés, mais tout aussi fiables.

Des tests YES et YAS, permettant respectivement la détection d'activité (anti)oestrogénique et (anti)androgénique en utilisant des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) génétiquement modifiées, font également partie des données collectées (Lv *et al.*, 2017; Westlund et Yargeau, 2017). Cependant, les données issues de ces deux publications ont dû être écartées à cause de leur manque de significativité statistique, du manque d'informations sur les concentrations utilisées et sur la pureté de la substance testée. Par ailleurs, aucun contrôle négatif, pourtant essentiel pour attester de la fiabilité des résultats *in vitro*, n'a été réalisé dans ces deux études. Bien que ces éléments manquants ne permettent pas de retenir ces études comme « études clefs fiables », elles restent utilisables dans l'approche WoE pour appuyer l'hypothèse d'un MoA (Schneider *et al.*, 2009).

Etant donné le faible nombre d'études traitant des effets du tébuconazole sur les invertébrés, l'analyse de la répétabilité des effets n'a pas été possible. En revanche, l'impact potentiel de la substance au niveau populationnel a été étudié. Les organismes étudiés sont relativement faciles à élever en grand nombre, par conséquent, un taux de croissance représentant la dynamique de population a pu servir pour postuler des effets néfastes. Néanmoins, aucune preuve d'activité endocrine n'ayant pu être démontrée chez ces organismes, avec aucun effet de type « *in vitro* mécaniste » pour les deux espèces d'invertébrés considérées (Sancho *et al.*, 2016; Turesson *et al.*, 2007), rendant impossible l'alimentation du « trépied » pour conclure au caractère ED de la substance.

4.2.3 Analyse des preuves et orientation de l'évaluation

D'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), affirmer l'absence d'effets EATS requiert des résultats négatifs de plusieurs tests standardisés de l'OCDE tel que spécifié précédemment dans ce rapport (cf. 4.1.3 Analyse initiale des preuves).

Dans le cas du tébuconazole, aucun résultat de test de reproduction sur une génération du medaka ou de test de reproduction sur deux générations de rat n'est disponible. Pour ce qui est de la modalité thyroïdienne, en revanche le test AMA est retrouvé dans le pool de données d'une étude (Bernabò *et al.*, 2016) qui utilise des paramètres expérimentaux du test LAGDA.

D'autre part, pour l'activité endocrine, les tests préconisés sont bien présents dans le pool de données, et ce pour les modalités EAS. Un modèle de prédiction ToxCast pour la modalité estrogénique, par exemple, indique une absence de liaison et d'activation du récepteur ER. Cette donnée permet d'écarter d'autres hypothèses non pertinentes de MoA. Pour la modalité androgénique, le test Hershberger sur rat a bien été réalisé dans l'étude de Taxvig (2007), mais ce test n'a pas montré d'effets (anti)-androgéniques. En revanche, il est difficile de conclure sur une absence d'effet (anti)-androgénique en se basant seulement sur le test Hershberger, car même si ce test est négatif *in vivo*, plusieurs autres résultats de tests *in vitro*, dont un issu d'un modèle de prédiction androgénique ToxCast, sont positifs.

Selon cette analyse, un scénario d'évaluation 1b peut être établi tel que présenté en Figure 9.

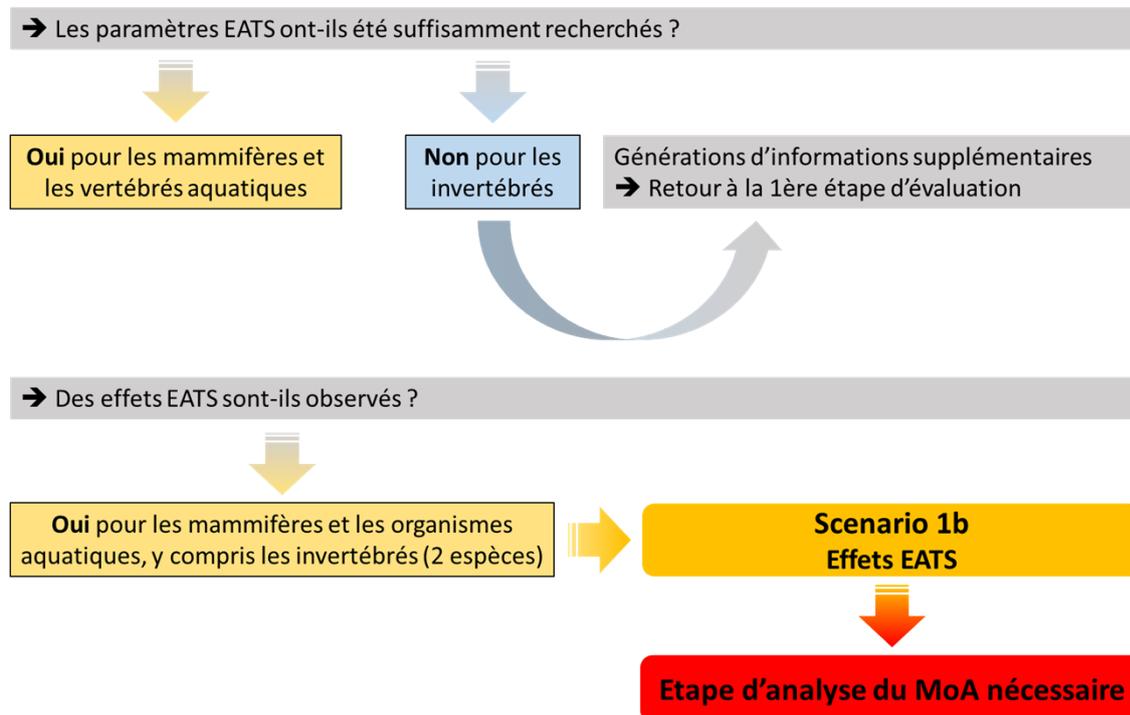


Figure 9 : Schéma récapitulant les résultats de l'analyse des preuves et le scénario obtenu pour l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.

Dans le cas du tébuconazole, les preuves répertoriées et évaluées conduisent donc vers un scénario 1b, car les paramètres EATS, preuves d'une activité endocrine, ont été suffisamment investigués, et des effets néfastes basés sur les paramètres EATS sont observés. La plausibilité biologique du lien entre effets néfastes et activité endocrine doit donc être documentée par l'analyse du MoA.

4.2.4 Analyse des Modes d'Action postulés

Des MoA ont été étudiés pour expliquer les effets endocriniens du tébuconazole. Etant donné que ce sont des MoA postulés, c'est-à-dire supposés et construits à partir d'informations provenant de sources différentes, certains sont plus plausibles que d'autres. C'est pourquoi les critères de Hill sont utilisés.

4.2.4.1 MoA chez les mammifères

Un premier MoA postulé chez les mammifères a été analysé. Il s'agit de l'inhibition de la stéroïdogénèse chez les mammifères par plusieurs événements clefs (Tableau 5). Ce MoA présente une forte plausibilité biologique – qui est un critère majeur pour l'évaluation du caractère ED selon l'approche WoE – à partir des événements clés observés à des niveaux cellulaires (KE). Il est fortement plausible qu'une diminution du nombre de cellules de Leydig associée à une diminution du nombre de cellules de Sertoli (KE 2), conduisent à une diminution du taux de testostérone. La spermatogénèse étant assurée essentiellement par la testostérone, la probabilité d'un lien de causalité entre la diminution de la synthèse de testostérone (KE 3) et l'effet néfaste observé (diminution de la densité et de la motilité spermatique) est donc élevée.

Tableau 5 : MoA n°1 « inhibition de la stéroïdogénèse chez les mammifères par plusieurs événements clefs, avec pour MIE une diminution de l'induction de la LH ». « (effet néfaste) » : effet considéré comme non prépondérant dans l'AOP en raison de son manque de répétabilité dans le pool de données du tébuconazole.

Etapes de l'AOP	Brève description de l'évènement clef (KE)	Critères de Hill
MIE	MIE à définir	Plausibilité biologique : Forte: Documentation importante et compréhension approfondie des KER Cohérence : Répétabilité des KEs du MoA postulé dans plusieurs études Analogie : KE 3 et effet adverse observés pour d'autres azoles (Ketoconazole et époxiconazole)
KE 1	Inhibition du métabolisme du cholestérol	
KE 2	Diminution du nombre de cellules de Sertoli et cellules de Leydig	
KE 3	Diminution de la synthèse de testostérone	
Effet adverse	Diminution de la densité et de la motilité spermatique	
(Effet adverse)	Diminution de la fertilité jusqu'à infertilité totale	

Cet AOP est jugé globalement cohérent au regard des lignes de preuves retrouvées dans plusieurs études (au total, 6 études démontrent des effets de diminution des taux de testostérone). Pourtant, il est difficile d'en établir l'évènement moléculaire initiateur (MIE). Il a été clairement établi que la LH, hormone lutéinisante antéhypophysaire, est responsable de l'induction du métabolisme stéroïdien *via* des actions enzymatiques sur le cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes (Behrman et Armstrong, 1969). De plus, la LH étant une stimuline, elle a pour rôle de stimuler la synthèse d'autres hormones, notamment la testostérone *via* les cellules de Leydig (Cooke *et al.*, 1976). Mais cet évènement ne peut être objectivement défini comme le MIE du MoA « inhibition de la stéroïdogénèse chez les mammifères, car l'expression de gènes codant pour les sous-unités bêta des gonadotropines suite à l'exposition à des composés azolés rapportée en certaines occurrences dans la littérature (e.g. Baudiffier *et al.*, 2012) est aussi interprétée comme un mécanisme compensatoire à l'inhibition de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes par les gonades.

En outre, le deuxième effet néfaste plausible « diminution de la fertilité jusqu'à infertilité totale », pourtant pertinent et issu d'une étude fiable, n'est pas retrouvé dans d'autres publications qui ont recherché les mêmes effets sur la fertilité. Une incertitude est donc associée au lien entre cette ligne de preuve et le reste du MoA. Néanmoins, un MIE issu de la base de données des AOP, consistant en une inhibition de l'activité CYP7B ou stéroïde-7 α -hydroxylase (Yantsevich *et al.*, 2017), non représenté dans le Tableau 5, a permis de clarifier le chemin de l'effet néfaste pour le MoA considéré. En effet, cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse du cholestérol et dans plusieurs étapes de son métabolisme en hormones stéroïdes (Toll *et al.*, 1994). Son inhibition conduirait donc à une altération de la

stéroïdogénèse ainsi qu'à d'éventuels problèmes métaboliques. Une étude reporte justement une augmentation du taux de cholestérol chez le rat (Joshi *et al.*, 2016). L'impact du tébuconazole sur le métabolisme du cholestérol peut donc ici être mis en relation avec le mode d'action du fongicide, pour lequel il est utilisé sur les champignons, c'est-à-dire l'inhibition d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ergostérol. L'effet d'inhibition de l'activité CYP7B n'est pas reporté dans le Tableau 5 en raison de l'absence de KE disponibles correspondant à ce MIE, même si on sait que la LH intervient sur plusieurs enzymes du métabolisme du cholestérol (Hanukoglu, 1992).

Au regard de l'approche WoE, il est donc effectivement pertinent d'approfondir ce premier MoA endocrinien, centré sur les mammifères. De plus, le critère d'analogie a été validé pour les KE 3 et le premier effet néfaste, ce qui vient soutenir l'hypothèse de ce MoA, dont une partie est commune à celui de l'époxiconazole, autre fongicide déjà identifié comme perturbateur endocrinien (ANSES, 2019). En outre, le fongicide kétoconazole partage aussi un KE avec le tébuconazole, et il a été démontré que cette substance inhibe également l'activité CYP7B chez les mammifères (Matsunaga *et al.*, 2004). Ces informations supplémentaires viennent appuyer le MoA postulé et la tendance des fongicides azolés, dont le tébuconazole, à perturber des activités enzymatiques métaboliques en plus d'engendrer de la perturbation hormonale.

Un second MoA inventorié chez les mammifères a été analysé. Il s'agit de l'antagonisme des récepteurs androgéniques (AR) avec pour MIE un modèle de prédiction ToxCast. Ce MoA, qui présente une forte plausibilité biologique, est renseigné dans le Tableau 6.

Tableau 6 : MoA n°2 « Antagonisme des récepteurs androgéniques (AR) avec pour MIE un modèle de prédiction ToxCast ». « (effet néfaste) » : effet considéré comme non prépondérant dans l'AOP en raison de son manque de répétabilité dans le pool de données du tébuconazole. « (KE 2) » : KE considéré comme incertain en raison d'une variation de l'effet dans le pool de données.

Etapes de l'AOP	Brève description de l'évènement clef (KE)	Critères de Hill
MIE	Antagonisme du récepteur aux androgènes (AR)	Plausibilité biologique : Forte : Documentation importante et compréhension approfondie des KER
KE 1	Inhibition de l'action des androgènes (DHT+testostérone)	
(KE 2)	Diminution du poids des organes reproducteurs	Cohérence : KE 2 incertain
Effet adverse	Diminution de la densité et de la motilité spermatique	Analogie : KE 1 et effet adverse observés pour le linuron et le DDE
(Effet adverse)	Diminution de la fertilité jusqu'à infertilité totale	Spécificité : Adversité issue d'un MoA endocrinien, inférieure aux MTD

D'après le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), les informations provenant de la base de données ToxCast sont considérées pertinentes et fiables par défaut. Par conséquent, l'antagonisme des récepteurs AR ici rapporté est un élément de poids dans l'approche WoE pour l'évaluation du tébuconazole. Ce modèle est considéré positif car le seuil de cytotoxicité n'est pas dépassé et le score de confiance est de 4/6. De plus, toujours dans le cadre de l'approche ToxCast, le tébuconazole est considéré « actif » dans le projet de collaboration d'experts sur les récepteurs androgéniques (CoMPARA) (Kamel *et al.*, 2017).

En outre, le screening *in vitro* des activités (anti)androgéniques a permis de constater que l'activité anti-androgénique du tébuconazole était du même ordre de grandeur que d'autres substances déjà interdites comme le linuron (herbicide) ou le DDE, métabolite du DDT (insecticide) (Kleinstreuer *et al.*,

2018). En plus d'entraîner une diminution de la synthèse d'hormones stéroïdes comme illustré dans le premier MoA, le tébuconazole montre donc un antagonisme des récepteurs AR avec une bonne cohérence, l'antagonisme ayant été observé en présence de deux agonistes différents, à savoir la testostérone, la DHT, et le R1881 (méthyltrienolone) (Kjaerstad *et al.*, 2010 ; Orton *et al.*, 2011).

La plausibilité biologique est également considérée « forte » pour ce MoA car les KE ainsi que leurs interrelations sont fondés sur une très bonne compréhension des processus biologiques, aussi bien sur l'action des androgènes sur leurs récepteurs (Brinkmann *et al.*, 1999), que sur l'effet de la réponse à cette activation sur les paramètres spermatiques et les organes reproducteurs (MacLeod *et al.*, 2010).

Il existe néanmoins une incertitude résiduelle de ce MoA relative au KE 2 concernant la diminution du poids des organes reproducteurs. En effet, dans les études analysées, le poids des organes reproducteurs est parfois resté inchangé (Taxvig *et al.*, 2007). Cela pourrait être dû aux différences notables de conditions expérimentales : variabilité importante des gammes de concentrations (de 6 à 250 mg/kg_{poids corporel}/jour), variabilité importante des durées d'exposition (de 15 jours à 45 jours), variabilité des stades de vie des organismes exposés (jeunes, adultes, femelles gestantes).

4.2.4.2 MoA chez les organismes aquatiques

Malgré une quantité assez importante de données sur les vertébrés aquatiques, il existe encore beaucoup d'incertitudes pour établir un MoA.

Pourtant, plusieurs types de MIE sont probables, comme des modulations de l'expression du gène TSH β (Bernabo *et al.*, 2016), gène de la thyroïdostimuline responsable de l'induction d'hormones T4 et T3 par la thyroïde (Bruni *et al.*, 1977). D'autres MIE consistent en des changements d'expressions des gènes TR α et TR β , mais toujours sans cohérence entre les études.

En ayant une approche holistique entre vertébrés (*Danio rerio* – *Xenopus laevis* – *Hyla intermedia*), on pourrait cependant orienter le MoA vers une possible perturbation du métabolisme des hormones thyroïdiennes et de leur action, conduisant à des effets néfastes développementaux, notamment chez l'espèce d'amphibien *Hyla intermedia* avec des malformations du squelette et une métamorphose perturbée (Bernabo *et al.*, 2016). Ce type d'effet pourrait avoir une forte plausibilité biologique avec des événements clés tels que la diminution de taux d'hormones T3 et T4 (White et Nicoll, 1981) que l'on retrouve chez *Danio rerio* avec plusieurs lignes de preuves fiables et significatives (Li *et al.*, 2019). La difficulté rencontrée lors de l'évaluation des données sur les organismes aquatiques est due à l'hétérogénéité des variations observées entre les lignes de preuves (augmentation *versus* diminution), aussi bien dans l'expression des gènes que dans les variations de taux d'hormones. Le gène Dio2 par exemple, dont la transcription augmente significativement chez les larves de *Danio rerio* exposées au tébuconazole, pourrait être relié à l'augmentation du taux de T3 chez ces larves (Yu *et al.*, 2013), Dio2 étant responsable de la synthèse des désiodases permettant le passage de T4 à T3 (Bianco et Kim, 2006). La plausibilité biologique de cette chaîne d'événements peut être considérée comme élevée. Il y a donc bien un faisceau de preuves pour la modalité thyroïdienne chez les organismes aquatiques, mais cela doit encore être renforcé par un jeu de données plus important et plus cohérent, notamment sur l'activité endocrine de *Danio rerio*, afin d'être en accord avec les effets néfastes sur amphibiens. Cependant, en gardant une approche holistique « vertébrés », la présence d'une ligne de preuve indiquant une diminution de T3 chez le rat (Taxvig *et al.*, 2007) constitue un élément encourageant pour la confirmation de ce MoA thyroïdien du tébuconazole.

Pour les invertébrés, le manque de données liées à l'activité endocrine et, plus généralement, la moins bonne connaissance du système endocrinien de ce taxon, qui empêche l'établissement d'un MoA. En effet, le jeu de données collectées révèle un déficit flagrant en KE, aucun paramètre mécanistique ne permettant de renseigner l'activité endocrine de la substance (ni *in vitro*, ni *in vivo*). De plus, la plausibilité biologique est difficile à évaluer en raison de la compréhension encore ténue des relations d'événements clés de type endocrinien chez les invertébrés aquatiques.

4.2.5 Conclusion sur le caractère ED du tébuconazole

Comme on a pu le démontrer, les MoA centrés sur les mammifères sont basés sur des effets EATS (inhibition de la stéroïdogénèse et antagonisme aux androgènes). Les critères d'activité endocrine et d'effet néfaste observable ou la manifestation d'un effet biologique délétère observable à l'échelle d'un organisme entier semblent remplis pour les mammifères, puisque les liens de plausibilité biologique entre les KE sont pertinents et cohérents pour chaque MoA, mais des preuves scientifiques approfondies supplémentaires sont nécessaires pour établir les liens entre un MIE plausible et les KE observés.

En revanche, au regard des difficultés rencontrées pour établir un MoA biologiquement plausible et cohérent, les critères EA et ED pour les organismes aquatiques sont considérés incomplets. D'une part, à cause des incertitudes relevées, et d'autre part à cause d'un déficit en KE pour les invertébrés, éléments indispensables pour conclure sur le lien entre activité endocrine et effets néfastes. Ceci est également valable pour un évènement impliquant une inhibition de l'activité enzymatique de l'aromatase. Cette dernière est responsable de la conversion d'androgènes en estrogènes. L'inhibition de cette enzyme pourrait donc conduire à des effets anti-estrogéniques, et par conséquent à un autre mode d'altération de la stéroïdogénèse.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, et les indications fournies par le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), on peut considérer que le tébuconazole remplit les critères d'identification de perturbateur endocrinien chez les mammifères. Pour ce qui est des organismes aquatiques, il n'est à ce jour pas encore possible de documenter un MoA avec l'ensemble de ses étapes, mais la bonne conservation du système endocrinien entre les taxons (Denver *et al.*, 2009) amène à penser à une perturbation de l'axe thyroïdien chez les vertébrés (dont les vertébrés aquatiques), en plus d'une perturbation androgénique et stéroïdogénique chez les mammifères.

4.3 Implications de l'évaluation du caractère ED pour l'EQS du tébuconazole

4.3.1 Raisonnement logique et présentation de l'EQS pré-existante

Compte tenu de la méthodologie de construction des QS et EQS reportée ci-avant (cf. section 2.3 La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et les Normes de Qualité Environnementale (NQE, ou EQS)), l'évaluation du caractère ED d'une substance peut impacter la valeur seuil à deux niveaux.

Dans un premier temps, la collecte des données d'EA et d'effets néfastes peut permettre d'apporter de nouvelles données, c'est-à-dire de nouvelles concentrations sans effets qui viendraient compléter le jeu de données existantes préalablement inventoriées lors de l'établissement de l'EQS. En effet, les données déjà collectées lors de l'établissement classique d'une EQS sont plus généralement des EC₅₀, EC₁₀ et NOEC correspondant à des effets dits « apicaux », c'est-à-dire des effets caractérisés par des réponses « phénotypiques » ou « observables » à l'échelle de l'individu (Krewski *et al.*, 2011). Par conséquent, l'évaluation du caractère ED au travers de l'application du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018) apporte nécessairement des données supplémentaires à celles existantes. Le jeu de données sous-jacent à l'établissement de la QS s'en trouve alors de fait modifié, soit que les données supplémentaires démontrent une toxicité de la substance plus importante que celle préalablement établie (EC₁₀ ou NOEC inférieures à celles préalablement inventoriées), soit que les données supplémentaires en modifient les caractéristiques avec par exemple, la représentativité de nouveaux taxons ou de nouvelles espèces ou des durées d'exposition différentes, ces deux cas de figure pouvant également être concomitants.

Dans un second temps, les situations potentielles citées ci-avant peuvent avoir pour conséquence une modification du facteur d'extrapolation, puisque celui-ci est dépendant du jeu de données sous-jacent à la détermination de la QS.

L'objectif de cette section est d'identifier si une ou plusieurs des situations précitées se présente(nt) dans le cadre de l'exercice de mise à jour de l'EQS du tébuconazole suite à l'évaluation du caractère ED de cette substance, et de déterminer quels en sont les impacts potentiels.

La valeur d'EQS actuellement publiée par l'INERIS pour le tébuconazole est disponible à l'adresse <https://substances.ineris.fr/fr/substance/getDocument/3059>.

Les valeurs de normes de qualité (QS) correspondantes à l'EQS se déclinent telles que présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Normes de Qualité (QS) pour le tébuconazole telles que proposées par l'INERIS dans la fiche EQS (INERIS, 2011).

		Valeur	Unité
PROPOSITION DE NORMES DE QUALITÉ			
Organismes aquatiques (eau douce) moyenne annuelle	AA-QS _{water_eco}	1	µg/L
Organismes aquatiques (eau douce) Concentration Maximum Acceptable	MAC	1	µg/L
Organismes aquatiques (eau marine) moyenne annuelle	AA-QS _{marine_eco}	0,1	µg/L
Organismes aquatiques (eau marine) Concentration Maximum Acceptable	MAC _{marine}	0,1	µg/L
Empoisonnement secondaire des prédateurs valeur correspondante dans l'eau (douce et marine)	QS _{biota sec pois}	2	mg/kg _{biota}
	QS _{water_sp}	0,03	mg/L
	QS _{marin_sp}		
Santé humaine via la consommation de produits de la pêche valeur correspondante dans l'eau (douce et marine)	QS _{biota hh}	183	µg/kg _{biota}
	QS _{water hh food} QS _{marine hh food}	2,3	µg/L
Santé humaine via l'eau destinée à l'eau potable	QS _{dw_hh}	0,1	µg/L

Exception faite des eaux destinées à la consommation humaine, l'EQS proposée par l'INERIS pour les eaux douces est déterminée sur la base de la QS pour la protection des organismes aquatiques, qui est de 1 µg/L.

4.3.2 QS pour la protection des organismes aquatiques

Les plus faibles données d'écotoxicité valides du jeu de données chroniques sous-jacentes à l'établissement de la QS pour la protection des organismes aquatiques sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Données d'écotoxicité chronique aquatique sous-jacentes à l'établissement de la QS pour la protection des organismes aquatiques lors de la détermination de l'EQS pour le tébuconazole (INERIS, 2011).

ECOTOXICITE AQUATIQUE CHRONIQUE

Organisme		Espèce	Critère d'effet	Valeur [mg/L]	Source
Algues plantes aquatiques	Eau douce	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	NOEC (72 h) statique	1.0	EFSA, 2007
		<i>Lemna gibba</i>	NOEC (14 j) statique	0.0342	EFSA, 2007
	Milieu marin	Pas d'information disponible			
Micro- crustacés	Eau douce	<i>Daphnia magna</i>	NOEC (21 j)	0.01	EFSA, 2007
	Milieu marin	<i>Americamysis bahia</i>	NOEC (28 j) flux continu	0.035	EFSA, 2007
	Sédiment	<i>Chironomus riparius</i>	EC ₁₅	2.51	EFSA, 2007
Poissons	Eau douce	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (83 j) flux continu	0.01	EFSA, 2007
	Milieu marin	Pas d'information disponible			

Le Tableau 8 indique que les invertébrés crustacés et les poissons sont plus sensibles que les algues et plantes aquatiques, avec une NOEC de 10 µg/L, même si la valeur de NOEC obtenue pour les plantes aquatiques est du même ordre de grandeur (34 µg/L).

En parallèle, le Tableau 9 rapporte les informations relatives aux deux lignes de preuves présentant les NOEC les plus faibles identifiées lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.

Tableau 9 : Plus faibles concentrations sans effets reportés pour les organismes aquatiques lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.

ED Parameter group	EATS-mediated
Taxa - species	Amphibian - <i>Hyla intermedia</i> (78d)
Life stage	Tadpole (M+F)
Endpoint	Developmental - Time to metamorphosis (NF stage 62)
Effect observed	Significant change in time to metamorphosis for the 5µg/L exposure concentration, but not for 50 µg/L exposure concentration
Remark	No guideline test is used, but some information about the use of acetone come from the OECD test N°241 (LAGDA)
Source	Bernabò et al. (2016)
NOEC	< 0.005 mg/L
LOEC	= 0.005 mg/L
ED Parameter group	In vivo mechanistic
Taxa - species	Fish - <i>Danio rerio</i> (60d)
Life stage	Adult (F0, F) ; Larval (M+F)
Endpoint	T3 and T4 level
Effect observed	Statistically significant change in female T4 level
Remark	No guideline test is used, but the fluctuation of exposure concentration met the requirement of toxicity test OECD (2013) Fish Early Life Stage Toxicity Test
Source	Li et al. (2019)
NOEC	0.05 mg/L
LOEC	0.2 mg/L

L'utilisation des données d'écotoxicité se rapportant à *Hyla intermedia* est délicate. En effet, seulement 2 concentrations d'exposition ont été testées dans ce test réalisé sur des larves d'amphibiens. Or, c'est l'exposition à la plus faible concentration d'exposition qui a donné lieu à des effets significatifs sur le processus de métamorphose, alors que la concentration d'exposition la plus forte est apparue sans effets. Par conséquent, il en résulte non seulement une absence de relation concentration-réponse (trop peu de traitements et concentration la plus forte sans effet), mais également une impossibilité de déterminer la NOEC, avec une LOEC établie à la plus faible concentration testée de 5 µg/L. Même si l'existence de cette donnée ne peut être ignorée, il est impossible de baser l'établissement de la QS sur celle-ci.

La plus faible concentration sans effets ensuite inventoriée est celle obtenue sur *Danio rerio* avec un test ELS de 60 jours lors duquel il a été observé des changements significatifs dans les niveaux d'hormone T4 chez les femelles. Une NOEC de 50 µg/L a été déterminée. Cette valeur est supérieure aux valeurs de NOEC de 10 µg/L précédemment reportées pour les crustacés et poissons avec des effets apicaux (cf. Tableau 8).

L'évaluation du caractère ED du tébuconazole n'apporte donc pas d'éléments d'information menant à abaisser la plus faible NOEC pré-existante (10 µg/L), donnée clé sur laquelle se base le calcul de la QS pour la protection des organismes aquatiques pour le tébuconazole.

4.3.3 QS pour la protection des prédateurs supérieurs

Le tébuconazole étant un polluant spécifique de l'état écologique pour lequel la valeur seuil doit tenir compte du risque d'empoisonnement secondaire envers les prédateurs supérieurs par l'ingestion de proies contaminées, il convient d'examiner également les données existantes concernant cet objectif de protection afin d'identifier les possibles changements apportés par l'évaluation du caractère ED de la substance sur cette QS spécifique. Le jeu de données sous-jacentes à la QS pour la protection des prédateurs supérieurs vis-à-vis de l'empoisonnement secondaire est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Données de toxicité sur les mammifères et oiseaux sous-jacentes à l'établissement de la QS pour la protection des prédateurs supérieurs vis-à-vis de l'empoisonnement secondaire lors de la détermination de l'EQS pour le tébuconazole (INERIS, 2011).

TOXICITE ORALE POUR LES MAMMIFERES

	Type de test	NOAEL [mg/kg _{corporel} /j]	Source	Facteur de conversion	NOEC [mg/kg _{biota}]
Toxicité sub-chronique et/ou chronique	Chien, voie orale, 1 an	3	EFSA, 2007	40	120
Toxicité sur la reproduction	Pas d'information disponible				

(1) NOEL : No Observed Effect Level

TOXICITE ORALE POUR LES OISEAUX

	Type de test	NOAEL/LOAEL [mg/kg _{corporel} /j]	Source	Facteur de conversion	NOEC [mg/kg _{biota}]
Toxicité sub-chronique et/ou chronique					
Toxicité sur la reproduction	<i>Colinus virginianus</i> 24 semaines, oral	5.8	EFSA, 2007	-	73.5

En parallèle, le Tableau 11 reporte les informations relatives à la ligne de preuve présentant la NOEC la plus faible reportée pour les oiseaux et mammifères lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.

Tableau 11 : Plus faible concentration sans effets reportés pour les mammifères lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole.

ED Parameter group	(1) EATS-mediated ; (2) Target organ toxicity
Taxa - species	Mammals - Rat (From GD14 to PND42 d)
Life stage	Adult (F0, F) ; Larval (M+F)
Route of admin.	Oral
Endpoint	(1) Age at Vaginal opening ; (2) Offspring Kidney weight and Adult (F0) Spleen weight
Effect observed	(1) Statistically significant effect on age at vaginal opening only in the middle-dose group ; (2) organ weight
Remark	No OECD test guideline were performed
Source	Moser et al. (2001)
NOEL	6 mg/kg bw/day
LOEL	20 mg/kg bw/day

L'évaluation du caractère ED du tébuconazole n'apporte donc pas d'éléments d'information conduisant à abaisser la plus faible NOEC pré-existante (5,8 mg.kg_{bw}⁻¹.j⁻¹), donnée-clé sur laquelle se base le calcul de la QS empoisonnement secondaire pour le tébuconazole.

4.3.4 Analyse globale de l'EQS

Dans la mesure où l'évaluation du caractère ED du tébuconazole n'induit pas de changement dans la QS déterminante de l'EQS (pas de plus faible NOEC répertoriée pour la protection des organismes aquatiques et pas de diminution de la QS pour la protection des prédateurs supérieurs en-deçà de la valeur préalablement établie pour la protection des organismes aquatiques), il convient d'approfondir l'examen de la NOEC déterminante de l'EQS au regard de ce que l'on sait de l'activité endocrine du tébuconazole suite à l'évaluation de son caractère ED.

Dans la mesure où la QS pour la protection des organismes aquatiques reste basée sur les NOEC de 10 µg/L obtenues sur les crustacés et les poissons et où les données relatives au caractère ED du tébuconazole ne semblent pas affecter les vertébrés en-deçà de cette valeur, il convient de se demander si les types de tests mis en œuvre pour l'obtention des NOEC les plus faibles pour les crustacés sont susceptibles de couvrir de potentiels effets de perturbation endocrine, afin d'ajuster éventuellement en conséquence le facteur d'extrapolation préalablement proposé.

Le test réalisé sur *Daphnia magna* est un test d'inhibition de la reproduction réalisé sur 21 jours. L'examen détaillé du rapport fourni pour ce test dans le dossier d'évaluation des risques indique que les paramètres d'effets mesurés sont la survie, la reproduction et les paramètres de croissance (taille et poids des parents). La NOEC de 10 µg/L est en outre basée sur le paramètre de reproduction, et plus précisément sur le nombre total de juvéniles produits, et le nombre de juvéniles produits par parent, pour lesquels des effets ont été observés à la concentration de 30 µg/L. Cette même concentration n'a en revanche pas d'effets significatifs sur les paramètres se rapportant au nombre de morts nés et du succès d'éclosion des œufs (pour lesquels la LOEC est de 90 µg/L). Il est en revanche à noter qu'aucune indication n'est donnée sur la production de mâles et le sex-ratio des juvéniles produits, alors que le document guide sur les lignes directrices de tests standardisés pour l'évaluation de la perturbation endocrine des substances chimiques de l'OCDE (OECD GD 150, OECD, 2018) recommande maintenant l'utilisation de ce paramètre pour l'estimation du potentiel de perturbation endocrine avec ce test sur la reproduction des daphnies. **D'après ces recommandations, il n'est pas possible d'affirmer que la NOEC de 10 µg/L obtenue sur les daphnies couvrirait un potentiel de perturbation endocrine du tébuconazole chez les invertébrés.**

Le test réalisé sur la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* est réalisé selon une exposition chronique d'une durée de 83 jours (correspondant à 60 jours après éclosion des œufs) et les paramètres mesurés sont la viabilité des embryons, la survie des organismes à l'éclosion et la survie et la croissance des larves. Même si des déviations mineures ont été identifiées par ses auteurs, il correspond à un test réalisé selon la ligne directrice OCDE 210 (FELS, OECD, 2013) et il est considéré comme fiable. Durant ce test, aucun effet néfaste n'a été observé sur le taux de survie des œufs fécondés ni sur l'éclosion des œufs, quelles que soient les concentrations d'exposition. En revanche, un impact statistiquement significatif a été observé sur la survie, le développement et le comportement des larves à toutes les concentrations d'exposition excepté la plus faible (12 µg/L). D'après, le GD 150 de l'OCDE, les anomalies de développement des larves pourraient être mises en relation avec une perturbation du fonctionnement thyroïdien. En effet, il existe des données limitées qui témoignent de résultats positifs de ce test sur les paramètres mesurés en réponse à une exposition à des substances perturbatrices du système thyroïdien. Par exemple, les récepteurs d'hormone thyroïdienne TR α et TR β sont tous deux présents dans les embryons et larves de poissons (Power *et al.*, 2001), et la thyroxine (T4) synthétisée lors de la gestation est importante pour certains processus thyroïde-dépendants dans les stades précoces de la vie des poissons (Nelson *et al.*, 2014). L'un de ces processus est le gonflement de la vessie natatoire, paramètre vital pour la survie des alevins de poissons parfois enregistré dans les tests FELS. Justement, le rapport d'étude correspondant au test FELS considéré indique des anomalies de développement des larves (paramètres de croissance et de poids), mais également une léthargie et une perte d'équilibre. Cette dernière observation pourrait être à mettre en rapport avec un dysfonctionnement de la vessie natatoire. Toutefois, le lien entre l'effet néfaste observé (anomalies de développement et de comportement des larves) et le mode d'action endocrinien potentiel (perturbation thyroïdienne) peut difficilement être établi sur la base des seules informations disponibles reportées avec ce test FELS, tant il existe de possibilités que ces effets apicaux surviennent en réponse à des modes d'action autres qu'endocriniens. Il convient donc d'être prudent quant aux conclusions à apporter. Ces informations peuvent néanmoins être mises en regard de celles apportées par l'examen des lignes de preuves lors de l'évaluation du caractère ED du tébuconazole, à savoir notamment les preuves *in vivo* d'une activité endocrine apportées sur les embryons, larves et stades adultes de poisson zèbre avec une diminution de la T3 et la T4 (Li *et al.*, 2019 ; Yu *et al.*, 2013).

Les informations ainsi synthétisées pour les données disponibles sur vertébrés permettent de confirmer que la NOEC de 10 µg/L existante rapportée chez les poissons avant l'évaluation ED permet de couvrir l'éventuel potentiel de perturbation endocrine du tébuconazole sur ce taxon. En l'absence de NOEC valide pour les amphibiens, il semble donc pertinent d'utiliser cette NOEC de 10 µg/L rapportée chez les poissons comme donnée de base à l'établissement de la QS pour la protection des organismes aquatiques, sous réserve que l'application du facteur d'extrapolation puisse permettre de couvrir les effets observés par ailleurs sur la métamorphose des larves d'*Hyla intermedia* à 5 µg/L.

Le maintien du facteur d'extrapolation de 10 pour les eaux douces, appliqué sur la NOEC de 10 µg/L obtenue pour *Oncorhynchus mykiss* ou pour *Daphnia magna* conduit donc à conserver une QS et une EQS de 1 µg/L, ce qui signifie que dans le cas du tébuconazole, l'évaluation de son caractère ED n'a pas pour impact de modifier la valeur de l'EQS, mais d'argumenter différemment sur sa robustesse. Cette discussion sur la robustesse n'en est pas pour autant évidente. En effet, il est tout à la fois notable de constater que l'examen de plus de 200 lignes de preuves d'activité endocrine ou d'effets néfastes (médié EATS ou non) permettrait de confirmer la pertinence de la NOEC préalablement choisie pour l'établissement de l'EQS sur la base d'effets apicaux, et notable de constater que cette analyse ne nous permet pas pour autant d'affirmer une robustesse maximale de l'EQS. En effet, si la valeur d'EQS de 1 µg/L est inférieure à la LOEC de 5 µg/L reportée chez l'amphibien *Hyla intermedia*, rien ne permet d'affirmer à ce stade quelles seraient la LOEC et la NOEC d'une étude similaire réalisée sur la même espèce avec des concentrations d'exposition inférieures.

5 Difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018)

La principale difficulté rencontrée lors de l'application du guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), a été de bien comprendre quels effets pouvaient être considérés comme néfastes. En effet, il n'existe pas de préconisations particulières quant à ces considérations pour les perturbateurs endocriniens, c'est pour cela que la définition de l'OMS a été retenue. Cette définition couvre l'ensemble des effets possibles, la problématique reste complexe. D'après une étude menée en 2016 par un ensemble d'experts (éco)toxicologues européens, l'effet néfaste devrait être défini au cas par cas, et dépendrait de nombreux facteurs, notamment de la significativité des résultats, de la nature de la physiopathologie observée, de la sévérité de l'effet et des paramètres du protocole expérimental (Palazzi *et al.*, 2016).

Par ailleurs, lors de la collecte des informations, il a été noté qu'un certain nombre d'études se focalisaient sur les effets des fongicides en mélange (Hass *et al.*, 2012; Jacobsen *et al.*, 2009). Ces études n'ont pas pu être intégrées dans l'étape d'évaluation puisqu'il fallait tout d'abord conclure sur le caractère ED du tébuconazole seul, mais la notion de « mélange » est mentionnée dans la définition de l'OMS sur les perturbateurs endocriniens. Il serait donc pertinent d'investiguer la potentialité d'effets additionnels ou synergiques, étant donné qu'une grande diversité de fongicides sont retrouvés présents simultanément dans différents types de bassins hydrographiques (Wightwick *et al.*, 2012).

L'hétérogénéité dans les lignes de preuves ainsi que les effets dépendants des fenêtres d'exposition constituent des limites dans l'évaluation en général. Ces limites pourraient être repoussées en utilisant davantage de données issues de protocoles standardisés, dans la mesure où celles-ci sont disponibles et associées à une description explicite des paramètres expérimentaux (nombre et gammes de concentrations). Certains de ces tests, tel que le test OCDE de reproduction sur une génération (OCDE, 2018) auraient pu apporter non seulement des preuves solides sur la possible survenue d'effets EAS par des mesures de l'apparition de caractères sexuels secondaires, mais également des preuves sur des MoA endocriniens non EATS, utiles pour rajouter du poids dans l'approche WoE, tels que l'immunotoxicité et la neurotoxicité développementales qui sont entre autres contrôlées par les hormones thyroïdiennes mais également par les hormones de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Bateman *et al.*, 1989).

D'autre part, la disponibilité de bioessais tels que, par exemple, le test sur épine femelle « androgénisée » (Pottinger *et al.*, 2009) permettrait de conclure sur les critères ED des organismes aquatiques. Chez les invertébrés, le test OCDE sur la reproduction de daphnies (OCDE, 2012) fait partie du pool de données et ce test a bien confirmé les effets néfastes chez ces organismes non-cibles, sans pour autant fournir des informations sur des variations hormonales et donc sur l'activité endocrine, qui

représente le pendant nécessaire de l'argumentaire pour constituer le « trépied » et conclure à un caractère ED de la substance.

Plus généralement, l'hétérogénéité des réponses observées est encore accentuée par la problématique des courbes doses-réponses non monotones (NMDR) et des effets dits « faibles doses ». Les NMDRs sont une difficulté supplémentaire dans le sens où elles compliquent la détermination de valeurs seuils. Il existe des débats entre les experts à ce sujet. Cependant, la plupart d'entre eux considèrent qu'il est possible et pertinent de déterminer des valeurs seuils pour les perturbateurs endocriniens (Munn et Goumenou, 2013). En ce qui concerne la problématique des « faibles doses » les experts recommandent le développement de méthodes plus sensibles, couvrant l'ensemble des effets éventuels et des fenêtres d'exposition de l'espèce testée. Ces remarques renforcent l'idée d'utiliser davantage de tests standardisés spécifiques de l'évaluation du caractère ED des substances chimiques. Enfin, l'analyse des incertitudes (ex : mécanismes compensatoires, toxicité systémique) de chaque ligne de preuves pourraient permettre de confirmer ou d'infirmer la prise en compte d'un effet d'augmentation ou de diminution de la réponse dans une NMDR.

Pour clore cette section dédiée aux difficultés rencontrées dans l'application de la méthodologie d'évaluation recommandée dans le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018), il est à noter qu'elle a l'avantage d'être précise, complète et de couvrir un large spectre des modalités EATS de la perturbation endocrine. En revanche, compte tenu du caractère prescriptif de chacune des étapes, de la collecte des données à la conclusion sur les critères d'activité et de perturbation endocrine, sa mise en œuvre est complexe et fastidieuse. L'aboutissement à une conclusion peut parfois se révéler difficile, comme c'est le cas pour les données concernant la toxicité du tébuconazole sur les organismes aquatiques, souvent moins nombreuses que celles sur la santé humaine, mais tout aussi fiables et pertinentes. L'arbre de décision résumant toute l'évaluation (Annexe 1), préconise de générer plus d'informations s'il n'y en a pas assez, pour constituer un MoA. Dans le cadre de la mise sur le marché d'une substance ou de l'évaluation des données dans un contexte réglementaire (examen dans le cadre du règlement REACH par exemple), la production de telles données peut se heurter à des obstacles temporels et financiers. Dans la présente étude, en revanche, l'évaluation s'est déroulée dans le cadre d'une réglementation en aval (i.e. évaluation a posteriori du risque), c'est-à-dire après production, mise sur le marché et potentielle contamination des milieux. L'évaluateur doit donc se satisfaire d'un jeu de données déjà existantes sur la substance concernée, sans qu'il soit possible d'envisager la production de données supplémentaires.

6 Conclusions et perspectives

L'état de l'art mené par l'INERIS en 2018 sur la prise en compte actuelle des propriétés d'activité ou de perturbation endocrine dans l'établissement des EQS avait permis de catégoriser des substances prioritaires pour l'étude et éventuellement la mise à jour de leur valeur seuil. Le travail s'est poursuivi en 2019 avec l'évaluation du caractère ED d'une substance et son impact dans l'établissement de son EQS. Cette étude de cas, menée sur le tébuconazole, a permis de prendre la mesure dans un premier temps de l'ampleur du travail nécessaire pour évaluer réglementairement la potentialité de perturbation endocrine d'une substance selon le guide européen d'identification des EDCs (ECHA/EFSA, 2018). Dans un second temps, la valeur ajoutée et l'impact de cette évaluation sur le raisonnement mené pour l'établissement de l'EQS ont été analysés. S'il est évident que l'évaluation du caractère ED du tébuconazole est un travail conséquent qui apporte une forte valeur ajoutée pour la complétude du jeu de données d'écotoxicité lors de l'établissement de l'EQS et de la compréhension de mécanismes d'action, l'étude de cas du tébuconazole nous démontre également que cet exercice ne mène pas forcément à l'abaissement de la valeur seuil, mais plutôt – dans une certaine mesure – à une amélioration de sa robustesse.

Ces travaux seront poursuivis en 2020 avec une seconde étude de cas sur le diclofénac afin d'alimenter une première réflexion pour des recommandations d'ordre méthodologique préliminaires pour une meilleure prise en compte des propriétés de perturbation endocrine des substances dans l'établissement de l'EQS.

7 Références

- Ågerstrand M., Küster A., Bachmann J., Breitholtz M., Ebert I., Rechenberg B. et Rudén C. (2011). "Reporting and evaluation criteria as means towards a transparent use of ecotoxicity data for environmental risk assessment of pharmaceuticals." Environmental Pollution **159**(10): 2487-2492.
- Ankley G.T., Bennett R.S., Erickson R.J., Hoff D.J., Hornung M.W., Johnson R.D., Mount D.R., Nichols J.W., Russom C.L., Schmieder P.K., Serrano J.A., Tietge J.E. et Villeneuve D.L. (2010). "Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(3): 730-741.
- ANSES (2019). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au caractère perturbateur endocrinien de l'époxiconazole., Saisine n°2018-SA-0289. pp. 19 avril 2019. <https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-relatif-au-caract%C3%A8re-perturbateur-endocrinien-de-l%C3%A9poxiconazole>.
- Bagiński M., Tempczyk A. et Borowski E. (1989). "Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics." European Biophysics Journal **17**(3): 159-166.
- Banman C., Alexander T. et Lam C. (2012). Amphibian metamorphosis assay with South African Clawed-frog (*Xenopus laevis*) exposed to tebuconazole under flow-through conditions. Laboratory Report No. EBHWP001. Stilwell, KA, Bayer CropScience.
- Bateman A., Singh A., Kral T. et Solomon S. (1989). "The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Endocrine reviews **10**(1): 92-112.
- Baudiffier D., Hinfrey N., Vosges M., Creusot N., Chadili E., Porcher J.-M., Schulz R.W. et Brion F. (2012). "A critical role of follicle-stimulating hormone (Fsh) in mediating the effect of clotrimazole on testicular steroidogenesis in adult zebrafish." Toxicology **298**(1): 30-39.
- Behrman H.R. et Armstrong D.D.T. (1969). "Cholesterol Esterase Stimulation by Luteinizing Hormone in Luteinized Rat Ovaries." Endocrinology **85**(3): 474-480.
- Bernabò I., Guardia A., Macirella R., Sesti S., Crescente A. et Brunelli E. (2016). "Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*)." Aquatic Toxicology **172**: 56-66.
- Bianco A.C. et Kim B.W. (2006). "Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action." The Journal of clinical investigation **116**(10): 2571-2579.
- Brinkmann A., Blok L., De Ruiter P., Doesburg P., Steketee K., Berrevoets C. et Trapman J. (1999). "Mechanisms of androgen receptor activation and function." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **69**(1-6): 307-313.
- Browne P., Judson R.S., Casey W.M., Kleinstreuer N.C. et Thomas R.S. (2015). "Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model." Environmental Science & Technology **49**(14): 8804-8814.
- Bruni J., Van Vugt D., Marshall S. et Meites J. (1977). "Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone." Life Sciences **21**(3): 461-466.
- C.E. (2000). Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, JO L 327 du 22.12.2000. pp. 1-86.
- Cooke B., Lindh M.L. et Janszen F.H. (1976). "Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone." Biochemical Journal **160**(3): 439-446.
- Denver R.J., Hopkins P.M., McCormick S.D., Propper C.R., Riddiford L., Sower S.A. et Wingfield J.C. (2009). "Comparative endocrinology in the 21st century." Integrative and Comparative Biology **49**(4): 339-348.
- Durda J.L. et Preziosi D.V. (2000). "Data Quality Evaluation of Toxicological Studies Used to Derive Ecotoxicological Benchmarks." Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal **6**(5): 747-765.

E.C. (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, OJ L 327, 22.12.2000. pp. 1-82.

E.C. (2004). Commission staff working document on implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706). Reference : SEC(2004) 1372. European Commission, Brussels. pp.

E.C. (2007). Commission staff working document on implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706), COM(2001) 262 and SEC (2004) 1372. Reference : SEC(2007) 1635. European Commission, Brussels. 30.11.2007. pp.

E.C. (2011). Commission staff working paper - 4th Report on the implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters" - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706). Reference : SEC(2011) 1001 final. European Commission, Brussels. 10.8.2011. pp.

E.C. (2018). Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards - Guidance Document No. 27 - Updated version 2018. Document endorsed by EU Water Directors at their meeting in Sofia on 11-12 June 2018. pp. 134+Appendices. <https://circabc.europa.eu/ui/group/9ab5926d-bed4-4322-9aa7-9964bbe8312d/library/ba6810cd-e611-4f72-9902-f0d8867a2a6b/details>.

ECHA (2012). How to report robust study summaries. Practical Guide 3 - Version 2.0 European Chemicals Agency, Helsinki, Finland. November 2012. pp. https://echa.europa.eu/documents/10162/13643/pg_report_robust_study_summaries_en.pdf/1e8302c3-98b7-4a50-aa22-f6f02ca54352.

ECHA/EFSA (2018). "Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009." EFSA Journal **16**((6) : 5311): 135.

EFSA (2007). Draft Assessment Report (DAR) - public version- Initial risk assessment provided by the rapporteur Member State Denmark for the existing active substance Tebuconazole of the third stage (part B) of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. European Food Safety Authority. November 2007. pp.

Groshart C. et Okkerman P.C. (2000). Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption: preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Final report (incorporating corrigenda to final report dated 21 June 2000). BKH Consulting Engineers, Delft, The Netherlands; in association with TNO Nutrition and Food Research, Zeist, The Netherlands, M0355008/1786Q/10/11/00. pp. 29.

Hanukoglu I. (1992). "Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **43**(8): 779-804.

Hass U., Boberg J., Christiansen S., Jacobsen P.R., Vinggaard A.M., Taxvig C., Poulsen M.E., Herrmann S.S., Jensen B.H., Petersen A., Clemmensen L.H. et Axelstad M. (2012). "Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides." Reproductive Toxicology **34**(2): 261-274.

Hill A.B. (1965). The environment and disease: association or causation?, Sage Publications.

Hobbs D.A., Warne M.S.J., Markich S.J. et Hobbs D.A. (2005). "Evaluation of criteria used to assess the quality of aquatic toxicity data." Integrated Environmental Assessment and Management **1**(3): 174-180.

INERIS (2011). NQE. Norme de Qualité Environnementale. Tébuconazole - n°CAS 107534-96-3. INERIS, DRC-11-112070-04266A. Mars 2011. pp. 18. <https://substances.ineris.fr/fr/substance/getDocument/3059>.

INERIS (2018). Vers une meilleure prise en compte de la perturbation endocrine dans la détermination des Normes de Qualité Environnementale – Phase I : premier état des lieux et catégorisation des substances. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques., Verneuil-en-Halatte, France, DRC-18-158732-11701A. pp. 28+Annexes.

- Jacobsen P.R., Christiansen S., Boberg J., Nellemann C. et Hass U. (2009). "Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats." International Journal of Andrology **33**(2): 434-442.
- Joshi S., Nandan G., Bhawana S. et Priyanka S. (2016). "Effects of tebuconazole (a fungicide) on reproduction of male rat." Int J Pharma Res Health Sci **4**(6): 1489-1494.
- Kamel M., Kleinstreuer N., Watt E., Harris J. et Judson R. (2017). CoMPARA: Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity.
- Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T. et Tilson H.A. (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop." Environmental Health Perspectives **104**(suppl 4): 715-740.
- Kjærstad M.B., Taxvig C., Nellemann C., Vinggaard A.M. et Andersen H.R. (2010). "Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals." Reproductive Toxicology **30**(4): 573-582.
- Kjærstad M.B., Andersen H.R., Taxvig C., Hass U., Petersen M.A., Metzdorff S.B. et Vinggaard A. (2007). "Effects of azole fungicides on the function of sex and thyroid hormones."
- Kleinstreuer N.C., Browne P., Chang X., Judson R., Casey W., Ceger P., Deisenroth C., Baker N., Markey K. et Thomas R.S. (2018). "Evaluation of androgen assay results using a curated Hershberger database." Reproductive Toxicology **81**: 272-280.
- Klimisch H.J., Andreae M. et Tillmann U. (1997). "A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data." Regulatory Toxicology and Pharmacology **25**: 1-5.
- Krewski D., Westphal M., Al-Zoughool M., Croteau M.C. et Andersen M.E. (2011). "New Directions in Toxicity Testing." Annual Review of Public Health **32**(1): 161-178.
- Kuster A., Bachmann J., Brandt U., Ebert I., Hickmann S., Klein-Goedicke J., Maack G., Schmitz S., Thumm E. et Rechenberg B. (2009). "Regulatory demands on data quality for the environmental risk assessment of pharmaceuticals." Regul Toxicol Pharmacol **55**(3): 276-80.
- Kwok I.M.-Y. et Loeffler R.T. (1993). "The biochemical mode of action of some newer azole fungicides." Pesticide Science **39**(1): 1-11.
- Lagarde F., Beausoleil C., Belcher S.M., Belzunces L.P., Emond C., Guerbet M. et Rousselle C. (2015). "Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment." Environmental Health **14**(1): 13.
- Le Maire A., Bourguet W. et Balaguer P. (2010). "A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions." Cellular and molecular life sciences **67**(8): 1219-1237.
- Le Roith D., Shiloach J., Roth J. et Lesniak M.A. (1980). "Evolutionary origins of vertebrate hormones: substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(10): 6184-6188.
- Li S., Wu Q., Sun Q., Coffin S., Gui W. et Zhu G. (2019). "Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring." Aquatic Toxicology **211**: 116-123.
- Lv X., Pan L., Wang J., Lu L., Yan W., Zhu Y., Xu Y., Guo M. et Zhuang S. (2017). "Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity." Environmental Pollution **222**: 504-512.
- Lynch H.N., Goodman J.E., Tabony J.A. et Rhomberg L.R. (2016). "Systematic comparison of study quality criteria." Regul Toxicol Pharmacol **76**: 187-98.
- MacLeod D.J., Sharpe R.M., Welsh M., Finken M., Scott H.M., Hutchison G.R., Drake A.J. et Van Den Driesche S. (2010). "Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs." International Journal of Andrology **33**(2): 279-287.
- Mansouri K., Abdelaziz A., Rybacka A., Roncaglioni A., Tropsha A., Varnek A., Zakharov A., Worth A., Richard A.M., Grulke C.M., Trisciuzzi D., Fourches D., Horvath D., Benfenati E., Muratov E., Wedebye

E.B., Grisoni F., Mangiatordi G.F., Incisivo G.M., Hong H., Ng H.W., Tetko I.V., Balabin I., Kancherla J., Shen J., Burton J., Nicklaus M., Cassotti M., Nikolov N.G., Nicolotti O., Andersson P.L., Zang Q., Politi R., Beger R.D., Todeschini R., Huang R., Farag S., Rosenberg S.A., Slavov S., Hu X. et Judson R.S. (2016). "CERAPP: Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project." Environmental Health Perspectives **124**(7): 1023-1033.

Matsunaga M., Ukena K., Baulieu E.-E. et Tsutsui K. (2004). "7 α -Hydroxypregnenolone acts as a neuronal activator to stimulate locomotor activity of breeding newts by means of the dopaminergic system." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(49): 17282-17287.

MEEM (2016). Plan micropolluants 2016 - 2021 pour préserver la qualité des eaux et la biodiversité. Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. pp. 71. <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/sites/default/files/Plan%20micropolluants%202016-2021%20pour%20pr%C3%A9server%20la%20qualit%C3%A9%20des%20eaux%20et%20la%20biodiversit%C3%A9.pdf>.

Milla S., Depiereux S. et Kestemont P. (2011). "The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review." Ecotoxicology **20**(2): 305-319.

Moermond C.T., Kase R., Korkaric M. et Ågerstrand M. (2016). "CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(5): 1297-1309.

MTES/MSS (2019). Deuxième Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (2019-2022) - Plan d'Actions. Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire / Ministère de la Santé et des Solidarités. pp. 60.

Munn S. et Goumenou M. (2013). "Key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances Report of the Endocrine Disruptors Expert Advisory Group." Institute for Health and Consumer Protection. Ispra.

Nelson K., Schroeder A., Ankley G., Blansma C., Kahl M., Lee M. et Villeneuve D.A. (2014). Evaluation of hypothesized adverse outcome pathway linking thyroid peroxidase to fish early life stage toxicity. SETAC, Vancouver, BC, CANADA, November 09 - 13, 2014.

OCDE (2001). Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264070868-en>.

OCDE (2009a). Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264076242-en>.

OCDE (2009b). Essai No. 441: Bio-essai de Hershberger sur le rat. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264076358-fr>.

OCDE (2011). Essai n° 456 : Essai de stéroïdogenèse H295R. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264122802-fr>.

OCDE (2012). Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264185203-en>.

OCDE (2015a). Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264242340-en>.

OCDE (2015b). Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264242258-en>.

OCDE (2018). Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. pp. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264185371-en>.

OECD (2013). Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. 26 July 2013. pp. 24. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264203785-en>.

OECD (2018). Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. pp. 688. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264304741-en>.

Orton F., Rosivatz E., Scholze M. et Kortenkamp A. (2011). "Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens." Environmental Health Perspectives **119**(6): 794-800.

Palazzi X., Burkhardt J.E., Caplain H., Dellarco V., Fant P., Foster J.R., Francke S., Germann P., Gröters S., Harada T., Harleman J., Inui K., Kaufmann W., Lenz B., Nagai H., Pohlmeyer-Esch G., Schulte A., Skydsgaard M., Tomlinson L., Wood C.E. et Yoshida M. (2016). "Characterizing "Adversity" of Pathology Findings in Nonclinical Toxicity Studies: Results from the 4th ESTP International Expert Workshop." Toxicologic Pathology **44**(6): 810-824.

Petersen G., Rasmussen D. et Gustavson K. (2007). Study on enhancing the Endocrine Disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. Report ENV.D.4/ETU/2005/0028r. DHI water & environment. 2007.06.04. pp. 252.

Pottinger T., Lancaster C., Mayer I., Morris S., Weymouth C., Scott A., Sanders M., Hurst M.M. et Burnham C. (2009). "The 21-day androgenised female stickleback endocrine screening assay."

Power D.M., Llewellyn L., Faustino M., Nowell M.A., Björnsson B.T., Einarsdottir I.E., Canario A.V.M. et Sweeney G.E. (2001). "Thyroid hormones in growth and development of fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **130**(4): 447-459.

Roelofs M.J.E., Temming A.R., Piersma A.H., van den Berg M. et van Duursen M.B.M. (2014). "Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro." Toxicology Reports **1**: 271-283.

Sancho E., Villarreal M.J. et Ferrando M.D. (2016). "Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times." Ecotoxicology and Environmental Safety **124**: 10-17.

Schneider K., Schwarz M., Burkholder I., Kopp-Schneider A., Edler L., Kinsner-Ovaskainen A., Hartung T. et Hoffmann S. (2009). "'ToxRTool", a new tool to assess the reliability of toxicological data." Toxicology Letters **189**(2): 138-144.

Segal D., Makris S.L., Kraft A.D., Bale A.S., Fox J., Gilbert M., Bergfelt D.R., Raffaele K.C., Blain R.B., Fedak K.M., Selgrade M.K. et Crofton K.M. (2015). "Evaluation of the ToxRTool's ability to rate the reliability of toxicological data for human health hazard assessments." Regul Toxicol Pharmacol **72**(1): 94-101.

Shukla S.J., Huang R., Austin C.P. et Xia M. (2010). "The future of toxicity testing: a focus on in vitro methods using a quantitative high-throughput screening platform." Drug Discovery Today **15**(23): 997-1007.

Taxvig C., Haas, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andersen, H.R. and Vinggaard, A.M. (2007). "Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole." Toxicological sciences **100**(20): 464-473.

Toll A., Wikvall K., Sudjana-Sugiaman E., Kondo K.H. et Björkhem I. (1994). "7 α Hydroxylation of 25-Hydroxycholesterol in Liver Microsomes: Evidence that the Enzyme Involved is Different from Cholesterol 7 α -Hydroxylase." European journal of biochemistry **224**(2): 309-316.

Turesson E.U., Stiernström S., Minten J., Adolfsson-Erici M., Bengtsson B.-E. et Breitholtz M. (2007). "Development and reproduction of the freshwater harpacticoid copepod *Attheyella crassa* for assessing sediment-associated toxicity." Aquatic Toxicology **83**(3): 180-189.

Vermeire T., Aldenberg T., Buist H., Escher S., Mangelsdorf I., Pauné E., Rorije E. et Kroese D. (2013). "OSIRIS, a quest for proof of principle for integrated testing strategies of chemicals for four human health endpoints." Regulatory Toxicology and Pharmacology **67**(2): 136-145.

Westlund P. et Yargeau V. (2017). "Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays." Science of the Total Environment **607-608**: 744-751.

White B.A. et Nicoll C.S. (1981). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In. Metamorphosis, Springer. pp. 363-396.

WHO (2002). Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. World Health Organization, Geneva, WHO/PCS/EDC/02.2. pp. 180.
http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/.

Wightwick A.M., Bui A.D., Zhang P., Rose G., Allinson M., Myers J.H., Reichman S.M., Menzies N.W., Pettigrove V. et Allinson G. (2012). "Environmental Fate of Fungicides in Surface Waters of a Horticultural-Production Catchment in Southeastern Australia." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **62**(3): 380-390.

Yantsevich A., Dichenko Y., Mackenzie F., Mukha D., Baranovsky A., Gilep A., Usanov S. et V Strushkevich N. (2014). Human steroid and oxysterol 7 α -hydroxylase CYP7B1: Substrate specificity, azole binding and misfolding of clinically relevant mutants.

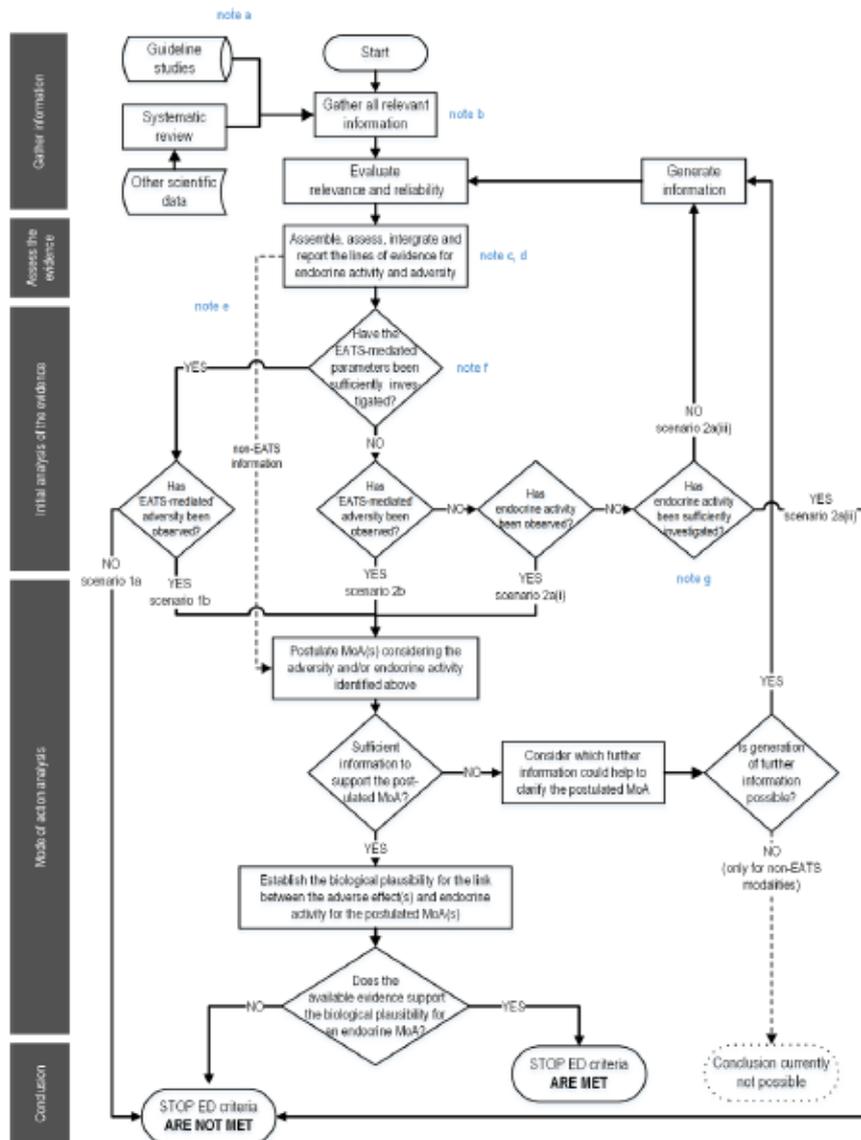
Yu L., Chen M., Liu Y., Gui W. et Zhu G. (2013). "Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole." Aquatic Toxicology **138-139**: 35-42.

8 Annexes

Annexe 1 : Arbre de décision résumant toute l'évaluation pour l'identification des perturbateurs endocriniens selon le guide ECHA/EFSA (ECHA/EFSA, 2018)

Annexe 2 : Données de toxicité du tébuconazole. Lignes de preuves pour les données *in vitro* mécanistiques et les données *in vivo* sur organismes non cibles aquatiques et pour les mammifères. Résultats positifs et négatifs traduisant l'absence d'activité endocrine, ou l'activité endocrine ou des effets néfastes de types endocriniens.

Annexe 1 : Arbre de décision résumant toute l'évaluation pour l'identification des perturbateurs endocriniens selon le guide ECHA/EFSA (ECHA/EFSA, 2018).



Annexe 2 : Données de toxicité du tébuconazole. Lignes d'informations pour les données *in vitro* mécanistiques et les données *in vivo* sur organismes non cibles aquatiques et pour les mammifères. Résultats positifs et négatifs traduisant l'absence d'activité endocrine, ou l'activité endocrine ou des effets néfastes de types endocriniens.

Toutes les lignes de preuves collectées sont présentées ici, mais pour des raisons de lisibilité, un grand nombre de colonnes a été supprimé et l'information collectée lors de l'évaluation n'est donc pas reportée ici de manière exhaustive.

Type of toxicity	Study principle	Study guideline (OECD/US EPA) or remarks	Reference (citation)	Reporting date	Species	Strain or in vitro model	Sex (administration)	Doses tested	Lowest dose tested	Highest dose tested	Dose unit	Duration of exposure	Duration unit	Sex (effect dose)	Lowest Effect dose	Effect type	Effect target	Effect classification	Effect description	Effect determination	Effect direction	NOAEL /NOEL/ NOEC	Unit	Effect indicative of	Relevance	Reliability
InVitroGeneral	In vitro method (general)	No OECD test guideline	wer Ruelofs et al.	2014	Rat	Murine Leydig tum	M + F	100	100	100	µM	48	Hours	M + F	100	Proliferation	[Not in list]	[Not in list]	Statistically si	Absolute	Increase	N/A	µM	0	Yes	Yes
InVitroEstrogen	Other ER in vitro assay	The ER in vitro assay used	ii Kjaerstad et al.	2010	Human	Human breast canc	M + F	Twenty cc	0.001	150	µM	6	Days	M + F	0,1	Proliferation	Estrogen rece	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	Between	µM	E	Yes	Yes
InVitroEstrogen	Other ER in vitro assay	No OECD test guideline	wer Westlund et al.	2017	Human	Recombinant yeast	M + F	Not report	N/A	N/A	other	72	Hours	M + F	N/A	Receptor bind	Estrogen rece	In vitro mecha	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	other	E	Yes	No
InVitroAndrogei	AR Binding Assay	For this endpoint the test us	Kjaerstad et al.	2010	Cricetulus	Ovary cell	M + F	Twenty cc	0.025	50	µM	5	Hours	M + F	3,1	Receptor (tran	Androgen rece	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	A	Yes	Yes	
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Lv et al.	2017	Human	Yeast strain Y187 tr	M + F	N/A	N/A	N/A	µM	2	Hours	M + F	N/A	Steroidogenes	Androgen rece	In vitro mecha	Change in the	Absolute	Decrease	N/A	µM	A	Yes	No
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Ruelofs et al.	2014	Rat	Murine Leydig tum	M + F	10	10	10	µM	48	Hours	M + F	10	Steroidogenes	Testosterone	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Ruelofs et al.	2014	Rat	Murine Leydig tum	M + F	0.3-10	0.3	10	µM	48	Hours	M + F	0,3	Steroidogenes	Testosterone	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Ruelofs et al.	2014	Human	Human breast canc	M + F	10*10^-5	10*10^-1	100	µM	24	Hours	M + F	100	Receptor bind	Androgen rece	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	µM	A	Yes	Yes
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Orton et al.	2011	Human	MDA-kb2 breast ca	M + F	0.00064	0.00064	50	µM	24	Hours	M + F	1	Receptor bind	Androgen rece	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	0,6	µM	A	Yes	Yes
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Westlund et al.	2017	Human	A recombinant yeas	M + F	Not report	N/A	N/A	other	24	Hours	M + F	N/A	Receptor bind	Androgen rece	In vitro mecha	A slight antag	Absolute	Change	N/A	other	A	Yes	No
InVitroAndrogei	Other AR in vitro assay	No OECD test guideline	wer Westlund et al.	2017	Human	A recombinant yeas	M + F	Not report	N/A	N/A	other	24	Hours	M + F	N/A	Receptor bind	Androgen rece	In vitro mecha	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	other	A	Yes	No
InVitroSteroido	H295R steroidogenesis	OECD Test guideline N°456	Kjaerstad et al.	2010	Human	Adrenocortical carc	M + F	Six concer	0.1	30	µM	48	Hours	M + F	0,1	Steroidogenes	Testosterone	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	Between	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroSteroido	H295R steroidogenesis	OECD Test guideline N°456	Kjaerstad et al.	2010	Human	Adrenocortical carc	M + F	Six concer	0.1	30	µM	48	Hours	M + F	3	Steroidogenes	Estradiol synt	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	Between	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroSteroido	H295R steroidogenesis	OECD Test guideline N°456	Kjaerstad et al.	2010	Human	Adrenocortical carc	M + F	Six concer	0.1	30	µM	48	Hours	M + F	10	Steroidogenes	Progesterone	In vitro mecha	Statistically si	Absolute	Increase	Between	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroSteroido	Other Steroidogenesis	ir No OECD test guideline	wer Meulenber et a	2002	Human	SHBG, serum of pr	M + F	0.001, 0.0	0.001	1000	other	48	Hours	M + F	0,001	Receptor bind	Estrogen relat	In vitro mecha	Slight ambigoi	Relative to tes	Increase	N/A	other	E	Yes	No
InVitroSteroido	Other Steroidogenesis	ir No OECD test guideline	wer Ruelofs et al.	2014	Rat	Murine Leydig tum	M + F	10	10	10	µM	6	Hours	M + F	N/A	Steroidogenes	Steroidogenes	In vitro mecha	No statistica	Absolute	No effect	N/A	µM	S	Yes	Yes
InVitroToxCast	ToxCast ER prediction	in US-EPA	Browne et al.	Me2015-2016	Rat	Not reported	N/A	N/A	N/A	N/A	other	N/A	N/A	N/A	0	Receptor bind	Estrogen rece	In vitro mecha	No effect repr	N/A	No effect	N/A	other	E	N/A	N/A
InVitroToxCast	ToxCast AR prediction	in US-EPA	Kleinstreuer et a	2015	Rat	Not reported	N/A	N/A	N/A	N/A	other	N/A	N/A	N/A	0,303	Receptor bind	Androgen rece	In vitro mecha	For tebuconaz	N/A	Change	N/A	other	A	Yes	Yes
InVitroToxCast	Tox21_TR_LUC_GH3_An	US-EPA	Freitas et al.	2014	Rat	GH3 pituitary gland cell	line	N/A	N/A	N/A	µM	28	Hours	N/A	63,19	Receptor bind	Thyroid recept	In vitro mecha	This toxcast s	N/A	Change	N/A	µM	T	Yes	Yes
InVitroToxCast	TOX21_Aromatase_Inhi	US-EPA	Chen et al.	2014	Human	MCF7 human breast cancer	N/A	N/A	N/A	N/A	µM	24	Hours	N/A	9,94	Enzyme inhibi	CYP19	In vitro mecha	This toxcast s	N/A	Change	N/A	µM	S	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_TESTO	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	2,93	Steroidogenes	Testosterone	In vitro mecha	This toxcast s	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_PROG	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	0,1	Steroidogenes	Progesterone	In vitro mecha	Quick evolutic	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_DHPRE	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	0,45	Steroidogenes	17-alpha-hydr	In vitro mecha	This toxcast s	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_11DCO	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	1,63	Steroidogenes	11-Deoxycorti	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_OHPRC	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	0,93	Steroidogenes	17-alpha-hydr	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_ESTRO	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	8,76	Steroidogenes	Estrone (in vit	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	No
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_ESTRO	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	8,7	Steroidogenes	Estradiol level	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E	Yes	No
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_DOC	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	0,56	Steroidogenes	11-Deoxycorti	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_CORTIS	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	5,28	Steroidogenes	Cortisol (in vit	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes
InVitroToxCast	CEETOX_H295R_ANDR	US-EPA	CEETOX	N/A	Human	Adrenal gland cell line	H295N/A	N/A	N/A	N/A	µM	48	Hours	N/A	3,78	Steroidogenes	Androstenedic	In vitro mecha	This toxcast r	N/A	Induction	N/A	µM	E, A, 5	Yes	Yes

Type of toxicity	Study principle	Study guideline (OECD/US EPA) or remarks	Reference (citation)	Reporting date	Species	Strain or in vitro model	Sex (administration)	Doses tested	Lowest dose tested	Highest dose tested	Dose unit	Duration of exposure	Duration unit	Sex (effect dose)	Lowest Effect dose	Effect type	Effect target	Effect classification	Effect description	Effect determination	Effect direction	NOAEL /NOEL/ NOEC	Unit	Effect indicative of	Relevance	Reliability
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	M+F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	1,14	In life observa	Survivorship	Systemic toxic	Longevity is al	Relative	Decrease	N/A	N/A	N/A	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	M+F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	F	0,41	Reproduction	Reproduction	EATS-mediate	Significant ch	Relative	Decrease	N/A	N/A	E, A, 5	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	M+F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	0,41	Reproduction	Reproduction	EATS-mediate	Significant ch	Relative	Increase	N/A	N/A	E, A, 5	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	0,41	Reproduction	Reproduction	Sensitive to t	Significant ch	Relative	Decrease	N/A	N/A	N	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	0,52	Reproduction	Reproduction	Sensitive to t	Significant ch	Relative	Decrease	N/A	N/A	N	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	M+F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	0,41	In life observa	Length	Sensitive to t	Significant ch	Relative	Decrease	N/A	N/A	N	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test Daphnia	ma OECD Guidelines for Testing	Sancho et al.,	2016	Daphnia	n Clone K6	M+F	0.41, 0.52	0.41	1.14	mg/L	water 14, 21 anc	Days	M+F	0,52	Reproductive	Reproduction	Sensitive to t	Significant ch	Relative	Decrease	0,41	mg/L	N	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test copepod	Ati N/A	Turesson et al.	2007	Atttheyella	Wild-type	M+F	20, 65, 22	20	770	µg/L	water 21	Days	M+F	20	In life observa	Body length	Sensitive to t	Significant ch	Absolute	Decrease	N/A	µg/L	w/N	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test copepod	Ati N/A	Turesson et al.	2007	Atttheyella	Wild type	M+F	20, 65, 22	20	770	µg/L	water 21	Days	M+F	65	In life observa	Mortality	Systemic toxic	Naupliar morti	Absolute	Increase	20	µg/L	w/ -	Yes	Yes
Invertebrates	Chronic test copepod	Ati N/A	Turesson et al.	2007	Atttheyella	Wild type	M+F	20, 65, 22	20	770	µg/L	water 14	Days	M+F	62	Reproductive	Reproduction	Sensitive to t	Significant ch	Absolute	Decrease	27	µg/L	w/N	Yes	Yes

Type of toxicity	Study principle	Study guideline (OECD/US EPA) or remarks	Reference (citation)	Reporting date	Species	Strain or in vitro model	Sex (administration)	Doses tested	Lowest dose tested	Highest dose tested	Dose unit	Duration of exposure	Duration unit	Sex (effect dose)	Lowest effect dose	Effect type	Effect target	Effect classification	Effect description	Effect determination	Effect direction	NOAEL/NOEC	Unit	Effect indicative of	Relevance	Reliability	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	15	Days	F	100	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Gestation leng	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Post implantat	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Numbers of er	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	No statistica	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Abnormalities	Nipple Develo	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Clinical chemi	Testosterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Clinical chemi	Other hormon	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Clinical chemi	Progesterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Clinical chemi	T3 and T4 leve	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	September	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M + F	N/A	Organ Weight	[Not in list]	[Not in list]	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M + F	50	Reproductive	Pre implantat	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M + F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	50	Clinical chemi	Estradiol level	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M	50	Clinical chemi	Progesterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effect of te	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effect of te	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	150	Organ Weight	Liver weight	(In vivo mecha	Statistically sig	Relative	Increase	100	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	N/A	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	N/A	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Adult male assay	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	150	Clinical chemi	Steroidogenes	In vivo mecha	Statistically sig	Relative	Decrease	100	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Adult male assay	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	60	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	No statistica	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Pregnant Sprague-D	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	In life observa	Mortality	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	N/A	Reproductive	Age at balano	EATS-mediate	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	20	Reproductive	Age at Vagina	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Decrease	6	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Organ Weight	Spleen weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Motor activity	Sensitive to, b	No overall eff	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Developmenta	Learning and	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Learning and	Sensitive to, b	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Brain morpho	Sensitive to, b	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Estrus cyclicit	EATS-mediate	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Fertility (mam	Sensitive to, b	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	60	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	20	Organ Weight	Kidney weight	Target organ t	Statistically sig	Absolute	Decrease	6	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Organ Weight	Liver weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Organ Weight	Spleen weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	N/A	Organ Weight	Epididymis we	EATS-mediate	No effect on r	Relative	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days														

Type of toxicity	Study principle	Study guideline (OECD/US EPA) or remarks	Reference (citation)	Reporting date	Species	Strain or in vitro model	Sex (administration)	Doses tested	Lowest dose tested	Highest dose tested	Dose unit	Duration of exposure	Duration unit	Sex (effect dose)	Lowest Effect dose	Effect type	Effect target	Effect classification	Effect description	Effect determination	Effect direction	NOAEL/NOEC	Unit	Effect indicative of	Relevance	Reliability	
Mammals	Peripubertal male and female	No OECD test guideline	wer Overgaard et al.	2013	Rat	Wistar	F	12.5, 50	12.5	50	mg/kg bw	GD7-21 +	Days	M + F	N/A	Clinical chemi	Steroidogenes	In vivo mecha	No statistical	Absolute	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Peripubertal male and female	No OECD test guideline	wer Overgaard et al.	2013	Rat	Wistar	F	12.5, 50	12.5	50	mg/kg bw	GD7-21 +	Days	F	N/A	Reproductive	Age at Vagina	EATS-mediate	No statistical	Absolute	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Peripubertal male and female	No OECD test guideline	wer Overgaard et al.	2013	Rat	Wistar	F	12.5, 50	12.5	50	mg/kg bw	GD7-21 +	Days	M	N/A	Reproductive	Age at balano	EATS-mediate	No statistical	Absolute	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	In life observa	Body weight	Systemic toxic	No statistical	Absolute	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Liver weight	Target organ t	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Kidney weight	Target organ t	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	[Not in list]	[Not in list]	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Heart weight	Target organ t	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Brain weight	Sensitive to, b	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Testis weight	EATS-mediate	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Epididymis we	EATS-mediate	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Seminal vesic	EATS-mediate	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Prostate weigl	EATS-mediate	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	LABC weight	EATS-mediate	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Organ Weight	Adrenals weig	Sensitive to, b	No statistical	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	25	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	10	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	10	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	N/A	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	10	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	N/A	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	25	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	10	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	25	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	10	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	25	Clinical chemi	Phase I enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	10	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	10	Clinical chemi	Phase II enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Increase	N/A	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	25	Clinical chemi	Phase II enzym	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	10	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Clinical chemi	Phase II enzym	In vivo mecha	No statistical	Absolute	No effect	N/A	other	E, A, T, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Reproductive	Sperm number	EATS-mediate	No statistical	Absolute	No effect	N/A	other	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	10	Reproductive	Sperm number	EATS-mediate	Statistical	sign	Absolute	Decrease	N/A	other	E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	N/A	Clinical chemi	Testosterone I	In vivo mecha	Change in tes	Absolute	No effect	N/A	other	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Mammals Not in list	No OECD test guideline	wer Yang et al.	2018	Rat	Wistar	M	10, 25, 50	10	50	mg/kg bw	28	Days	M	10	Clinical chemi	Testosterone I	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	other	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Organ Weight	Testis weight	EATS-mediate	Statistically si	Relative	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Organ Weight	Epididymis we	EATS-mediate	Statistically si	Relative	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Organ Weight	Seminal vesic	EATS-mediate	Statistically si	Relative	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15	Days	M	250	Organ Weight	Prostate weigl	EATS-mediate	Change in pro	Relative	No effect	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	30, 45	Days	M	250	Organ Weight	Prostate weigl	EATS-mediate	Statistically si	Relative	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Reproductive	Sperm number	EATS-mediate	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Reproductive	Sperm motility	EATS-mediate	Statistically si	Absolute	Change	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Reproductive	Fertility (mam	Sensitive to, b	Change in per	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	30, 45	Days	M	250	Clinical chemi	Testosterone I	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	30, 45	Days	M	250	Clinical chemi	Follicle Stimul	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	30, 45	Days	M	250	Clinical chemi	Luteinizing Ho	In vivo mecha	Statistically si	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15	Days	M	250	Organ histopa	Testis histopa	EATS-mediate	Statistically si	Absolute	Change	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	30	Days	M	250	Organ histopa	Testis histopa	EATS-mediate	Statistically si	Absolute	Change	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	45	Days	M	250	Organ histopa	Testis histopa	EATS-mediate	Statistically si	Absolute	Change	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	
Mammals	Adult male assay	No OECD test guideline	wer Joshi et al.	2016	Rat	Albino Rattus norve	M	250	250	250	mg/kg bw	15, 30, 45	Days	M	250	Clinical chemi	[Not in list]	[Not in list]	Statistically si	Absolute	Increase	N/A	mg/kg	E, A, S	Yes	Yes	

Type of toxicity	Study principle	Study guideline (OECD/US EPA) or remarks	Reference (citation)	Reporting date	Species	Strain or in vitro model	Sex (admin/strat)	Doses tested	Lowest dose tested	Highest dose tested	Dose unit	Duration of exposure	Duration unit	Sex (effect/dose)	Lowest effect dose	Effect type	Effect target	Effect classification	Effect description	Effect determination	Effect direction	NOAEL/NOEC	Unit	Effect indicative of	Relevance	Reliability	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	15	Days	F	100	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Gestation leng	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Post implantat	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	30	Days	F	100	Reproductive	Numbers of er	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		Yes	Yes	
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	No statistica	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Abnormalities	Nipple Develo	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	100	Clinical chemi	Testosterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Clinical chemi	Other hormon	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M	50	Clinical chemi	Progesterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	2007	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	F	100	Clinical chemi	T3 and T4 leve	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Decrease	50	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	N/A	Taxvig et al.	September	Rat	Wistar	F	50, 100	50	100	mg/kg bw	14	Days	M + F	N/A	Organ Weight	[Not in list]	[Not in list]	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M + F	50	Reproductive	Pre implantat	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M + F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	50	Clinical chemi	Estradiol level	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M	50	Clinical chemi	Progesterone	In vivo mecha	Statistically sig	Absolute	Increase	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effect of te	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	One-generation reprodu	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	F	50	50	50	mg/kg bw	14 (GD7-C	Days	F	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effect of te	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	150	Organ Weight	Liver weight	(In vivo mecha	Statistically sig	Relative	Increase	100	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	N/A	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Hershberger assay	Hershberger bioassay in rat	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	N/A	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Adult male assay	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	150	Clinical chemi	Steroidogenes	In vivo mecha	Statistically sig	Relative	Decrease	100	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Adult male assay	No test guideline was used	Taxvig et al.	October 20	Rat	Wistar	M	50, 100, 150	150	150	mg/kg bw	10	Days	M	N/A	No relevant ef	No relevant ef	No relevant ef	No effects on	Relative	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	60	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	No statistica	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Pregnant Sprague-D	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	In life observa	Mortality	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	In life observa	Body weight	Systemic toxic	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Abnormalities	Ano-Genital di	EATS-mediate	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	N/A	Reproductive	Age at balano	EATS-mediate	No effects of t	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	20	Reproductive	Age at Vagina	EATS-mediate	Statistically sig	Absolute	Decrease	6	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Organ Weight	Spleen weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Developmenta	Pup developm	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Motor activity	Sensitive to, b	No overall eff	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	60	Developmenta	Learning and	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Decrease	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Learning and	Sensitive to, b	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M + F	N/A	Developmenta	Brain morpho	Sensitive to, b	No effects on	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Estrus cyclicit	EATS-mediate	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Fertility (mam	Sensitive to, b	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	N/A	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	No tebuconaz	Absolute	No effect	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	F	60	Reproductive	Litter size	Sensitive to, b	Statistically sig	Absolute	Decrease	N/A	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	20	Organ Weight	Kidney weight	Target organ t	Statistically sig	Absolute	Decrease	6	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Organ Weight	Liver weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	60	Organ Weight	Spleen weight	Target organ t	Statistically sig	Relative	Increase	20	mg/kg		10	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	M	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1	Days	M	N/A	Organ Weight	Epididymis we	EATS-mediate	No effect on r	Relative	No effect	N/A	mg/kg		E, A, S	Yes	Yes
Mammals	Chronic toxicity	No OECD test guideline wer	Moser et al.	2001	Rat	Sprague-Dawley	F	0, 6, 20, 66	60	60	mg/kg bw	From GD1															

