

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à l'analyse de l'étude de Séralini *et al.* (2012)
“Long term toxicity of a ROUNDUP herbicide
and a ROUNDUP-tolerant genetically modified maize”

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 24 septembre 2012 par la Ministre des affaires sociales et de la santé, la Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, le Ministre de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la Forêt et le Ministre délégué auprès du Ministre de l'économie et des finances, chargé de l'économie sociale et solidaire et de la consommation d'une demande d'avis relatif à l'analyse de l'étude « Long term toxicity of a ROUNDUP herbicide and a ROUNDUP-tolerant genetically modified maize » (Séralini *et al.* 2012).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le 19 septembre 2012, la revue Food and Chemical Toxicology a publié une étude de Séralini *et al.* portant sur la toxicité à long terme d'un ROUNDUP et du maïs NK603 tolérant au glyphosate. Les auteurs de cette étude font état notamment d'une augmentation de la mortalité et du taux de tumeurs chez plusieurs lots de rats nourris pendant deux ans avec du maïs NK 603, tolérant au glyphosate traité ou non au ROUNDUP WEATHER MAX ou abreuvés avec de l'eau contenant diverses doses de l'herbicide ROUNDUP GT PLUS.

L'Anses a aussitôt été informée d'une future saisine visant à :

- déterminer si cette publication est de nature à remettre en cause ou non les conclusions des évaluations précédentes sur cet OGM ou sur l'herbicide Roundup et notamment si elle peut être considérée comme conclusive quant au risque sanitaire que pourraient présenter les aliments issus de plantes OGM comportant l'événement NK603,
- d'évaluer sur cette base, si le protocole mis en œuvre et les conclusions de cette étude remettent en cause les lignes directrices actuelles ou à venir en matière d'évaluation des risques sanitaires.

En parallèle le gouvernement français a également saisi le Haut conseil des biotechnologies (HCB) sur la partie spécifiquement liée au maïs NK 603.

Cette publication a été commentée le jour même de sa parution dans le journal Food Chem Tox dans un article de l'hebdomadaire le *Nouvel observateur*. L'écho médiatique de cette étude a été très important et a relancé un débat sociétal animé sur la question des OGM et des produits phytopharmaceutiques.

De nombreux scientifiques ou groupes de scientifiques se sont très rapidement exprimés dans la presse écrite ou *via* internet et ont émis, pour nombre d'entre eux des critiques concernant la valeur de l'étude tandis que d'autres ont plutôt mis en avant la pertinence des questions posées, le caractère novateur de l'étude et ses qualités intrinsèques.

Par ailleurs plusieurs agences des Etats membres de l'Union européenne et l'EFSA¹ ont également été saisies et ont rendu des avis limités à la critique scientifique de l'étude notamment l'EFSA, le BfR², le RIVM³ et le DTU⁴. Ces instances concluent que les affirmations des auteurs ne sont pas suffisamment étayées par des preuves expérimentales en raison de l'insuffisance du protocole, de la présentation et de l'interprétation de l'étude. Ils appellent également à la transmission des données complètes de l'étude par les auteurs. Le BfR souligne toutefois que les résultats de cette étude peuvent fournir une contribution à l'étude expérimentale de la possible influence des co-formulants sur les effets à long terme des produits phytopharmaceutiques.

Les documents transmis à l'Anses par la société Monsanto formulent des critiques comparables.

C'est donc dans un contexte polémique, dans un délai contraint et après une première expression d'un bon nombre de scientifiques et d'instances d'expertise collective que l'Anses est amenée à proposer son analyse des travaux réalisés dans la publication de Seralini *et al.* (2012) et à se prononcer également sur la pertinence de reconsidérer les modalités d'évaluation des risques sanitaires des OGM et des produits phytopharmaceutiques.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été menée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Un groupe d'expertise collective d'urgence (GECU « NK603 R »), composé d'experts multidisciplinaires, a été créé par l'Anses. Sa composition (annexe 1) et les déclarations publiques d'intérêt des experts seront publiées simultanément avec le présent avis. Il s'est réuni les 28 septembre, 3 et 15 octobre et a validé son compte rendu d'expertise par voie télématique le 19 octobre 2012. L'Anses a également eu plusieurs échanges avec le HCB et une rencontre avec des représentants du GECU et du HCB a eu lieu le 17 octobre.

L'Anses a participé à plusieurs réunions d'informations mutuelles organisées par l'EFSA, le 28 septembre, le 11 et le 18 octobre.

L'Anses a organisé deux auditions le 10 octobre 2012 qui font l'objet de comptes rendus validés par les personnes auditionnées et publiés en même temps que le présent avis, elles concernent :

- Plusieurs co-auteurs de la publication (MM. Seralini, Spiroux de Vendômois, Defarge Gress, et Mesnage), entendus afin de présenter leurs résultats, d'apporter certains éléments de réponse à l'Anses et de présenter leurs opinions sur les modalités d'évaluation des risques sanitaires des OGM et des produits phytopharmaceutiques.
- M. François Veillerette, Président de l'association « Générations futures », entendu afin d'apporter l'éclairage de son association sur les modalités d'évaluation des risques sanitaires des OGM et des produits phytopharmaceutiques.

La société Monsanto a été également sollicitée et a préféré compte tenu des délais transmettre des éléments d'information sous forme écrite le 17 octobre, publiés également, en même temps que le présent avis.

¹ Autorité européenne de sécurité des aliments

² Bundesinstitut für Risikobewertung

³ National Institute for Public Health and the Environment

⁴ Danmarks Tekniske Universitet

A la suite de l'audition, M. Séralini a transmis à l'Anses le 15 octobre, des données brutes relatives aux mortalités des animaux (données correspondantes à la figure 1 de l'article Séralini *et al.*, 2012) et d'apparition des tumeurs non régressives (données correspondantes à la figure 2 de l'article) sans distinction de la nature des tumeurs.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE D'EXPERTISE COLLECTIVE D'URGENCE (GECU)

Pour comprendre le contexte dans lequel s'inscrit la publication de Séralini *et al.* (2012), et pouvoir répondre aux questions posées, il est notamment nécessaire :

- de préciser le contexte réglementaire et les bases scientifiques qui sous-tendent de manière générale l'autorisation des OGM et des produits phytopharmaceutiques,
- de dresser un inventaire des publications scientifiques pertinentes dans le cadre du présent avis permettant de réaliser une étude critique des principales publications en lien direct avec les questions posées.

Sommaire du chapitre 3

3.1 Contexte réglementaire d'autorisation des organismes génétiquement modifiés et des substances phytopharmaceutiques	4
3.1.1. Processus d'expertise et exigences en matière d'autorisation des OGM.....	4
3.1.1.1 Processus d'expertise et d'autorisation des OGM.....	4
3.1.1.2 Les lignes directrices d'évaluation des OGM.....	4
3.1.1.3 Participation de l'Agence à l'évolution des lignes directrices.....	7
3.1.2 : Processus d'expertise et exigences en matière d'autorisation des substances phytopharmaceutiques	7
3.1.2.1 : Processus d'expertise et d'autorisation des substances et préparations phytopharmaceutiques	7
3.1.2.2 : Les lignes directrices d'évaluation des produits phytopharmaceutiques	8
3.2 Inventaire des études toxicologiques disponibles sur les OGM et les préparations à base de glyphosate.....	11
3.2.1 Recherche bibliographique des études pertinentes dans le cadre de cette saisine sur les plantes génétiquement modifiées.....	11
3.2.2 : Recherche bibliographique des études pertinentes dans le cadre de cette saisine pour les préparations à base de glyphosate	12
3.3 Etude critique des études à long terme les plus pertinentes	13
3.3.1 Description des études.....	13
3.3.1.1 L'étude de Malatesta <i>et al.</i>	13
3.3.1.2 L'étude de Sakamoto <i>et al.</i>	13
3.3.1.3 L'étude de Séralini <i>et al.</i>	14
3.3.2 Analyse critique des études.....	16
3.3.2.1 L'étude de Malatesta <i>et al.</i>	16
3.3.2.2 L'étude de Sakamoto <i>et al.</i>	16
3.3.2.3 L'étude de Séralini <i>et al.</i>	17
3.4 Conclusions du GECU	25

3.1 Contexte réglementaire d'autorisation des organismes génétiquement modifiés et des substances phytopharmaceutiques

3.1.1. Processus d'expertise et exigences en matière d'autorisation des OGM

3.1.1.1 Processus d'expertise et d'autorisation des OGM

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) sont définis comme des organismes ou des microorganismes dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas par multiplication ou recombinaison naturelle (article 2 de la directive 2001/18).

Grâce à des techniques de génie génétique, il est possible de transférer des gènes sélectionnés d'un organisme à un autre, parfois entre espèces différentes. Cette technique permet d'introduire dans le patrimoine génétique d'un organisme, un ou plusieurs gènes codant des protéines conférant de nouvelles propriétés à l'organisme ainsi modifié. L'ensemble des séquences d'ADN insérées est nommé « transgène ». Les gènes introduits peuvent provenir d'une large gamme d'organismes vivants du fait de l'universalité du code génétique. Cette technique peut être appliquée aux microorganismes, aux végétaux et aux animaux. A ce jour, les applications ayant fait l'objet d'une demande de mise sur le marché pour une utilisation dans l'alimentation humaine ou animale concernent principalement des plantes génétiquement modifiées (PGM).

Depuis 2003⁵, les OGM font l'objet d'un cadre réglementaire européen spécifique (règlement CE N°1829/2003⁶). Ce règlement définit pour les OGM (animaux, plantes, micro-organismes,...), les modalités d'évaluation des risques pour l'alimentation humaine et animale et pour l'environnement et confie cette évaluation à l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

L'EFSA offre toutefois, en matière d'OGM, la possibilité aux autorités compétentes des Etats membres d'évaluer l'ensemble des éléments des dossiers et de transmettre leurs commentaires. En France, les autorités compétentes sont le ministère délégué auprès du ministère de l'économie et des finances, chargé de l'économie sociale et solidaire et de la consommation et le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Ces autorités saisissent d'une part l'Anses concernant l'évaluation de la sécurité pour l'homme et l'animal des OGM rentrant dans l'alimentation et d'autre part le HCB (Haut Conseil des Biotechnologies) plus particulièrement sur les risques environnementaux.

L'instruction du dossier par l'Anses comprend l'examen des données fournies, la vérification de leur validité scientifique et de leur conformité aux exigences réglementaires ainsi que l'évaluation des risques sanitaires au regard des éléments du dossier. Au terme de cette instruction, menée selon les principes de l'évaluation collective appliqués à l'Anses, les conclusions de l'évaluation sont présentées dans un avis. Cet avis permet d'orienter le vote français au cours de la procédure d'autorisation à la Commission européenne.

Pour 55 % des dossiers instruits sur des plantes génétiquement modifiées, l'Agence a estimé que les données fournies par l'industriel n'étaient pas suffisantes pour permettre de conclure sur la sécurité sanitaire liée à la consommation de l'OGM et ces dossiers ont fait l'objet de demandes complémentaires transmises à l'EFSA.

3.1.1.2 Les lignes directrices d'évaluation des OGM

En 2002, l'Afssa a élaboré des lignes directrices pour permettre d'évaluer la sécurité des OGM destinés à une utilisation en alimentation humaine et animale (AFSSA 2002). Dès l'adoption du Règlement 1829/2003, l'EFSA a travaillé à la construction de lignes directrices pour préciser les exigences de ce Règlement. Selon ces lignes directrices (EFSA 2006; EFSA 2009b; EFSA 2011b), le dossier d'autorisation doit comporter une série d'études dont l'objectif est d'identifier et de

⁵ Avant 2003, les demandes d'utilisation en « alimentation humaine » étaient régies dans le cadre du règlement CE N°258/97, dit « Novel Food ». Ce règlement prévoyait pour les denrées alimentaires qui n'étaient pas consommées traditionnellement en Europe avant 1997 (y compris les OGM), une évaluation du risque préalable à leur autorisation. L'utilisation d'OGM en alimentation animale était régie par la directive 2001/18.

⁶ RÈGLEMENT (CE) No 1829/2003 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0001:0023:FR:PDF>

caractériser d'éventuels effets néfastes liés à la consommation par l'homme ou l'animal d'une plante génétiquement modifiée ou de ses produits dérivés.
Les lignes directrices fixent une liste de données à fournir par l'entreprise devant figurer dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché européen d'un OGM.

3.1.1.2.1 : Données analytiques

Caractérisation moléculaire

Un premier jeu de données sert à la caractérisation moléculaire de la plante modifiée. Le dossier doit ainsi présenter :

- La séquence de l'ADN du transgène introduit dans la plante pour vérifier qu'elle correspond parfaitement aux séquences décrites dans le vecteur de transgénèse,
- Des résultats d'analyse permettant de décrire la ou les protéine(s) telle(s) qu'elle(s) sont présente(s) dans la plante GM,
- La caractérisation des régions génomiques encadrant le transgène (régions de bordures de l'insert) pour vérifier que l'insertion n'ait pas eu lieu dans une séquence codante, et évaluer la possibilité de production de protéines ou de peptides chimériques,
- Des analyses bioinformatiques de recherche d'homologie entre la ou les protéines produites par le transgène, les peptides pouvant être produits dans les régions de bordures de l'insert et les protéines ou peptides répertoriés comme toxiques ou allergènes,
- Les résultats sur la stabilité génétique de l'insert dans la plante au cours des générations successives.

Analyse comparée de la plante GM et de son témoin

Le dossier doit également comporter des données agronomiques et de composition chimique afin de comparer la plante GM et son témoin le plus proche (lignée quasi isogénique) (EFSA 2011a) sur ses propriétés agronomiques et phénotypiques et sur sa composition chimique. L'analyse de composition chimique porte sur plusieurs dizaines de composés principaux (acides aminés, acides gras...), sur des composés ayant des propriétés nutritionnelles importantes comme les vitamines, et sur certains métabolites et facteurs antinutritionnels. La nature de ces derniers dépend des espèces végétales considérées et est déterminée dans des documents guides OCDE spécifiques de chaque espèce (OCDE⁷).

Les échantillons étudiés proviennent de plantes cultivées en champs sur plusieurs sites et parfois sur plusieurs saisons pour prendre en compte différentes conditions environnementales. Le schéma expérimental doit suivre rigoureusement les recommandations de l'EFSA en termes de répétitions et de nombres de sites et doit comporter des variétés commerciales non transgéniques de la même espèce. L'analyse des données doit suivre des méthodes statistiques précises (EFSA 2009a). En conclusion, l'analyse de ces résultats permet de démontrer ou non l'équivalence de composition sur les composés analysés entre la plante GM et son témoin non GM.

3.1.1.2.2 : Etudes de toxicité, d'alimentarité et allergénicité

Etudes de toxicité

L'évaluation de la toxicité potentielle de la plante GM et d'absence d'effets néfastes sur la santé humaine et animale est une étape essentielle de l'évaluation du dossier. Elle s'appuie sur des études toxicologiques réalisées chez l'animal de laboratoire (rongeurs essentiellement). Il s'agit d'essais de toxicité standardisés au niveau international (OCDE, annexe 2) et réalisés dans les conditions définies par les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) (annexe 2) dont le pétitionnaire doit également fournir le rapport d'étude complet.

Les tests sur animaux devant être réalisés sont :

- Une étude de toxicité aiguë par administration unique de la protéine produite par le transgène à plusieurs lots de souris examinées par la suite pendant 14 jours. Dans le cas

⁷ Consensus Documents for the Work on the Safety of Novel Foods and Feeds
<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/consensusdocumentsfortheworkonthesafetyofnovelfoodsandfeeds.htm>

de protéines nouvelles une administration répétée pendant 28 jours chez la souris (EFSA 2011b) est réalisée⁸,

- Une étude de toxicité sub-chronique chez le rongeur par administration répétée *via* l'alimentation d'une partie de la plante pendant 90 jours. Les résultats de croissance, de consommation et les paramètres hématologiques, biochimiques sanguins et urinaires sont comparés entre les groupes d'animaux ayant reçu la plante GM et les groupes d'animaux ayant reçu la plante témoin.

Cet essai de toxicité sub-chronique chez les rongeurs pendant 90 jours n'était pas initialement exigé de façon systématique dans les lignes directrices de l'EFSA. En France, l'Anses ne statue pas sur les dossiers relatifs aux événements primaires de transformation génétique sans la présence de cet essai. Une démarche de la Commission européenne est actuellement en cours pour rendre ces études obligatoires. Elle s'inscrit dans le cadre de l'intégration des lignes directrices en annexe du Règlement 1829/2003.

Actuellement, des études toxicologiques ciblées sur la fonction de reproduction et de développement (reproduction, développement, tératogénicité...) ne sont pas exigées. Mais elles peuvent être demandées en fonction de l'exposition potentielle, de la nature et de l'importance quantitative des différences de composition chimique observées entre l'OGM et son témoin non GM ou encore en fonction des résultats des études d'alimentarité et de toxicité sub-chronique pendant 90 jours.

Etude d'alimentarité

Afin de démontrer l'équivalence nutritionnelle des produits destinés à l'alimentation animale, l'analyse de composition chimique est souvent complétée par une étude d'alimentarité. L'objectif est de vérifier que des groupes d'animaux nourris avec un aliment issu d'une plante génétiquement modifiée présentent les mêmes caractéristiques zootechniques (croissance, poids, état de santé,...) que des groupes nourris avec un aliment issu des plantes isogéniques et de variétés commerciales de la même plante. Ces tests sont souvent réalisés sur des poulets, sur une période couvrant la durée de vie économique standard d'un poulet de chair (42 jours).

D'autres éléments d'analyses *in vitro* ou bioinformatiques viennent aussi documenter cette partie du dossier :

- Des tests de digestibilité *in vitro* pour mimer la digestion intestinale ou gastrique chez l'homme ou l'animal et vérifier ainsi la destruction de la protéine et des peptides qui en résultent pendant le processus de digestion,
- L'analyse physico-chimique de la ou des protéine(s) produite(s) par le transgène,
- L'analyse bioinformatique de comparaison des séquences de la ou des protéine(s) produite(s) par le transgène avec les séquences des protéines et peptides répertoriées comme toxiques dans les bases de données publiques.

Evaluation de l'allergénicité potentielle

Récemment, l'évaluation de l'allergénicité des OGM destinés à l'alimentation humaine et animale a fait l'objet d'un avis détaillé de l'EFSA (EFSA 2010). Les éléments nouveaux de cet avis ont été intégrés dans la révision des lignes directrices (EFSA 2011b). Elle prévoit d'une part :

- l'évaluation de l'allergénicité de la ou des protéines nouvellement exprimée(s) notamment l'origine du gène, les caractéristiques structurale, biologique et physicochimique, la comparaison de l'homologie de séquence des acides aminés entre la protéine nouvellement exprimée et des allergènes connus, des tests de résistance à la pepsine et de digestibilité *in vitro* ;
- et d'autre part, l'évaluation de l'allergénicité de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) issus de la plante génétiquement modifiée entière avec si nécessaire, l'analyse de l'éventuelle surexpression du ou des allergènes endogènes naturels.

⁸ Il convient de préciser que ces essais, qui nécessitent une grande quantité de protéines, sont souvent conduits avec une protéine (codée par le même gène) mais produite dans une bactérie. Un ensemble d'études montrant l'équivalence entre la protéine testée et celle exprimée dans la PGM est fourni dans le dossier.

3.1.1.3 Participation de l'Agence à l'évolution des lignes directrices

Comme d'autres agences des Etats membres de l'Union européenne et en collaboration avec l'EFSA, l'Anses contribue à l'établissement et à l'évolution de documents guide destinés aux industriels.

Dès 2002, l'Afssa a fortement contribué à renforcer les exigences (en matière de données et d'essais) auxquelles doivent répondre les industriels en identifiant les points sensibles de l'évaluation des risques sanitaires liées à la consommation d'OGM (AFSSA 2002). L'Agence a été la première en Europe à s'intéresser à l'adaptation du protocole de l'étude de toxicité sub-chronique par administration orale pendant 90 jours à l'évaluation des PGM.

De plus, l'Anses a rendu en 2011 un avis sur les modalités d'analyse statistique des données de cette étude se traduisant par des recommandations dans la mise en œuvre des protocoles et les méthodes d'analyse à utiliser pour garantir la fiabilité des résultats. Cet avis préconise notamment une augmentation du nombre d'animaux pour augmenter la puissance des tests (ANSES 2011).

3.1.2 : Processus d'expertise et exigences en matière d'autorisation des substances phytopharmaceutiques

3.1.2.1 : Processus d'expertise et d'autorisation des substances et préparations phytopharmaceutiques

L'évaluation des substances actives entrant dans la composition des préparations phytopharmaceutiques, et des préparations elles-mêmes en vue de leur commercialisation, est strictement encadrée et harmonisée au niveau européen par le règlement (CE) n°1107/2009⁹, qui a remplacé la directive 91/414/CEE¹⁰, en vigueur jusqu'en juin 2011.

Deux phases sont nécessaires :

- la **première phase** d'évaluation, réalisée de façon collective entre Etats membres de l'Union européenne, porte sur l'identification des dangers des **substances actives** et sur l'évaluation des risques liés à une préparation de référence, en vue de statuer sur l'approbation ou non de ces substances en Europe.
- la **seconde étape** vise, pour les substances actives approuvées, à évaluer les bénéfices agronomiques et les risques liés aux **préparations** commerciales ; elle est réalisée selon trois zones géographiques (Nord, Centre et Sud) : la France se situe dans la zone Sud.

En France, les industriels déposent un dossier de demande d'AMM¹¹ auprès de la direction des produits réglementés de l'Anses.

L'instruction du dossier comprend :

- L'examen des données fournies et la vérification de leur validité scientifique ainsi que de leur conformité aux exigences réglementaires,
- L'évaluation des risques et bénéfices agronomiques liés à l'utilisation de la préparation.

Au terme de cette instruction, menée selon les principes de l'évaluation collective appliqués à l'Anses, les conclusions de l'évaluation accompagnées dans certains cas de recommandations de mesures de gestion sont présentées dans un avis. Les conclusions relatives à l'acceptabilité du risque se réfèrent aux critères indiqués dans le règlement (UE) n°546/2011¹². Elles sont formulées en termes d' "acceptable" ou "inacceptable" en référence à ces critères.

C'est sur cet avis de l'Anses que la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) s'appuie pour délivrer ou non une AMM ou toute modification d'une AMM en vigueur. Cette AMM est délivrée lorsque, dans des conditions normales d'utilisation associées aux bonnes pratiques agricoles, la

⁹ Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.

¹⁰ Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 transposée en droit français par l'arrêté du 6 septembre 1994 portant application du décret 94/359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques.

¹¹ AMM : autorisation de mise sur le marché.

¹² Règlement (UE) n° 546/2011 de la Commission du 10 juin 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les principes uniformes d'évaluation et d'autorisation des produits phytopharmaceutiques.

préparation est jugée efficace et exempte d'effet inacceptable pour la santé humaine, la santé animale et l'environnement. La décision d'AMM précise notamment :

- la(les) culture(s) visée(s) pour le traitement,
- le(s) ravageur(s), maladie(s) ou adventice(s) visé(s),
- la dose d'utilisation, la période et la fréquence d'application de la préparation, les autres pratiques agricoles associées au traitement,
- les restrictions portant sur les conditions d'emploi et les mesures de gestion.

Il est à noter que les substances actives et les préparations associées font l'objet d'une ré-évaluation systématique selon une périodicité définie par le règlement (CE) n°1107/2009.

3.1.2.2 : Les lignes directrices d'évaluation des produits phytopharmaceutiques

Les règlements d'exécution du règlement (CE) n°1107/2009 qui sont, pour les substances actives, le règlement (UE) n° 544/2011¹³, et pour les préparations le règlement (UE) n°545/2011¹⁴, précisent quelles sont les données exigées dans les dossiers et les méthodes à mettre en œuvre pour les obtenir. Ces règlements renvoient explicitement à des lignes directrices méthodologiques adoptées par des organismes européens ou internationaux, tels que l'OCDE¹⁵, la FAO¹⁶ et l'OEPP¹⁷ et sont complétés par près de 200 documents guides techniques, adoptés au niveau communautaire, qui détaillent les modèles à retenir, les paramètres à prendre en compte ainsi que les valeurs par défaut à intégrer dans les modèles en cas d'absence de données jugées valides dans le dossier. Ces documents guides sont disponibles sur le site de la Commission européenne. L'absence de données exigées ainsi que la présentation de données non conformes conduisent à une conclusion de risque inacceptable ou à la prise en compte, lorsqu'elles existent de valeurs par défaut, toujours pénalisantes pour le notifiant.

En ce qui concerne plus spécifiquement les données utilisées pour l'évaluation des risques pour la santé humaine, les exigences sont résumées ci-dessous.

Les dossiers relatifs aux **substances actives** permettent de caractériser les propriétés intrinsèques de ces substances et donc les dangers qu'elles présentent, pour l'homme et l'environnement. Pour évaluer les effets sur la santé humaine, ils doivent comporter notamment les rapports complets des études de toxicité et de métabolisme chez les mammifères suivantes, réalisées en appliquant les lignes directrices définies par la réglementation et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire :

- études de métabolisme chez l'animal,
- études de toxicité aiguë par voie orale, voie cutanée, inhalation,
- études d'irritation cutanée, d'irritation oculaire,
- étude d'hypersensibilisation retardée cutanée,
- études de toxicité par administration orale répétée à court, moyen, long terme et étude de cancérogenèse,
- études de mutagénicité,
- étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations et études des effets sur le développement,
- études de neurotoxicité en fonction des propriétés des substances,
- autres études en fonction des résultats obtenus dans les études précédentes notamment pour une meilleure identification des effets et des mécanismes d'action.

¹³ Règlement (UE) n° 544/2011 de la Commission du 10 juin 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences en matière de données applicables aux substances actives.

¹⁴ Règlement (UE) n° 545/2011 de la Commission du 10 juin 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences en matière de données applicables aux produits phytopharmaceutiques.

¹⁵ OCDE : organisation de coopération et de développement économiques.

¹⁶ FAO : organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

¹⁷ OEPP : organisation européenne et méditerranéennes pour la protection des plantes.

Les lignes directrices OCDE pour les études de toxicité à long terme et les études de cancérogénèse sont résumées en annexe 2.

Plus spécifiquement, pour caractériser les effets à long terme de la substance active, tels que ceux étudiés dans l'article de Séralini *et al.* (2012), il est exigé deux études à long terme et de cancérogénèse réalisées chez des espèces différentes (rat et souris : 50 animaux par lot) afin d'évaluer les effets généraux et les potentiels effets cancérogènes de la substance lors d'administration quotidienne durant la vie entière des rongeurs.

Dans ces études, sont suivis et mesurés de nombreux paramètres physiologiques, biochimiques et histologiques chez les animaux. Ils permettent d'étudier la relation dose-effet, le mécanisme d'action toxicologique, la réversibilité des effets, l'existence d'un seuil pour les effets indésirables, la spécificité d'espèce et la potentialité d'une extrapolation des effets à l'homme.

Sur la base des effets les plus sensibles observés dans ces études, des doses toxicologiques de références (DJA¹⁸, ARfD¹⁹, AOEL²⁰) sont calculées pour chaque substance active au terme de l'évaluation collective européenne. Elles seront ultérieurement utilisées pour l'évaluation des risques associés à l'utilisation de préparations phytopharmaceutiques contenant la substance.

Les dossiers doivent également contenir des rapports d'études sur le métabolisme et les résidus dans les végétaux (et les denrées d'origine animale lorsqu'elles sont concernées). Pour chaque denrée destinée à la consommation humaine, d'origine végétale ou animale, la nature du résidu est définie (substances actives et éventuellement métabolite(s) pertinent(s)). Ensuite une LMR²¹ est déterminée pour chaque substance active et chaque denrée, de façon à garantir que l'exposition du consommateur demeure inférieure aux valeurs considérées comme sans risque pour la santé à court et long terme.

Une **préparation phytopharmaceutique** est constituée d'une ou plusieurs substances actives, le plus souvent associée(s) à un ou plusieurs co-formulants, utiles pour préparer ou stabiliser la formulation (aqueuse, poudre, granulé, suspension...) ou destinés à modifier la disponibilité de la substance active vis-à-vis du ravageur cible (parasites, adventices). Le dossier de demande d'AMM est présenté pour un ou plusieurs usages précis, un usage étant défini par la culture traitée, la cible du traitement, la quantité de produit utilisée par hectare, la période et la fréquence d'utilisation. L'évaluation d'une préparation concerne pour la santé humaine les risques que leur utilisation peut entraîner pour l'applicateur du traitement, le travailleur agricole intervenant sur le végétal traité et toute personne passant à proximité lors de l'application, ainsi que les risques pour le consommateur (risques chroniques et aigus pour les adultes, bambins²² et nourrissons, pour des régimes alimentaires différents et pour les eaux de boisson).

Les dossiers de demande d'AMM doivent contenir les éléments permettant de caractériser les préparations, leurs teneurs en substances actives et en co-formulants, et de déterminer les dangers associés et notamment les rapports complets des études de toxicité chez les mammifères suivantes, réalisées en appliquant les lignes directrices définies par la réglementation et dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire :

- Etudes de toxicité aiguë de la préparation, pour déterminer notamment la toxicité du produit par rapport à la substance active et si possible le mode d'action toxique, par

¹⁸ DJA : la dose journalière admissible d'un produit chimique est une estimation de la quantité de substance active présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).

¹⁹ ARfD : la dose de référence aiguë d'un produit chimique est la quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée sur une brève période, en général au cours d'un repas ou d'une journée, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).

²⁰ AOEL : l'Acceptable Operator Exposure Level (niveaux acceptable d'exposition pour l'opérateur) est la quantité maximum de substance active à laquelle l'opérateur peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé.

²¹ LMR : limite maximale applicable aux résidus.

²² Enfants âgés de 13 à 18 mois.

voie orale, par voie cutanée et, lorsqu'une exposition par cette voie est possible, par inhalation,

- Eudes d'irritation cutanée et d'irritation oculaire,
- Etude de sensibilisation cutanée.

Le dossier contient également des données toxicologiques relatives aux substances non actives. Grâce au processus harmonisé au niveau communautaire²³, des classifications fondées sur une évaluation des dangers coordonnée par l'Agence européenne des produits chimiques sont publiées pour un grand nombre de substances et co-formulants.

L'ensemble des éléments disponibles permet de caractériser la préparation et en particulier de proposer, sur la base de sa composition en substance(s) active(s) et co-formulant(s) et de leurs propriétés, une classification correspondant aux dangers présentés par cette préparation,

L'évaluation des risques prend en compte le danger déterminé pour la préparation et le niveau d'exposition, mesuré lors d'essais ou estimé par des modèles.

Les essais, réalisés avec chaque préparation, permettant d'estimer l'exposition et dont les rapports complets sont exigés avec le dossier sont les suivants :

- Etude d'absorption cutanée
- Essais résidus dans les produits traités, les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

Dans le cas particulier des préparations phytopharmaceutiques destinées à traiter des cultures OGM tolérantes à la substance active, des essais résidus sur la culture OGM concernée sont exigés (annexe 3).

A ce jour, la réglementation, conformément à l'avis des experts européens, n'exige aucune étude de toxicité à long terme sur la préparation formulée (substance active + co-formulants). Une telle exigence entraînerait une multiplication des essais sur vertébrés, dont il est actuellement considéré qu'ils doivent être limités au strict nécessaire.

Les effets à long terme de la substance active sont caractérisés et, en ce qui concerne les co-formulants, des données toxicologiques sont disponibles. Le règlement (CE) n°1107/2009 prévoit de dresser dans son annexe III une liste de co-formulants ne pouvant pas entrer dans la composition des préparations phytopharmaceutiques. Cette liste est actuellement en cours de constitution et sera mise à jour pour prendre en compte l'actualisation des connaissances sur les dangers. Toute nouvelle information mettant en évidence un danger est toutefois déjà prise en compte. Ainsi, l'utilisation de dérivés polyéthoxylés du nonylphénol, en tant que co-formulant dans les préparations phytopharmaceutiques et biocides a été interdite²⁴, en raison de leurs propriétés de perturbation endocrinienne. En cas de données insuffisantes ou de doute sur la toxicité à long terme d'un co-formulant, les modalités définies dans le règlement REACH²⁵ pour l'évaluation des substances chimiques permettent de demander aux déclarants la réalisation d'études supplémentaires.

Par ailleurs, les résultats des études de toxicité aiguë réalisées avec la préparation sont comparés aux résultats attendus au regard des propriétés connues de la ou des substance(s) active(s) afin d'identifier des écarts qui conduiraient à des interrogations sur la toxicité de co-formulants.

La question des risques cumulés fait l'objet de discussions au niveau européen. Une méthodologie d'évaluation a été retenue par l'Anses, qui la met en œuvre pour les préparations phytopharmaceutiques dès lors que plusieurs constituants sont classés pour des propriétés cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction. Cette méthodologie, basée sur une approche par organe cible et mécanisme d'action, est décrite dans une note d'information disponible sur le site internet de l'Anses.

²³ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

²⁴ Directive 2003/53/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2003 portant vingt-sixième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil concernant la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (nonylphénol, éthoxylate de nonylphénol et ciment).

²⁵ Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les règles applicables à ces substances.

Certains co-formulants peuvent avoir une influence sur l'exposition des personnes à (aux) substance(s) actives de la préparation soit, lors de l'application, en agissant sur l'absorption de ces substances, soit, pour le consommateur de denrées, en modifiant le niveau de résidus présents dans les cultures traitées. C'est pourquoi une étude d'absorption cutanée, ainsi que des essais destinés à mesurer les niveaux de résidus dans les plantes traitées après traitement, réalisés avec la préparation phytopharmaceutiques sont systématiquement exigés.

3.2 Inventaire des études toxicologiques disponibles sur les OGM et les préparations à base de glyphosate

Les études toxicologiques nécessaires à l'instruction des dossiers réglementaires et à l'autorisation des OGM et des produits phytopharmaceutiques, décrites dans la partie précédente sont examinées par les instances en charge d'émettre un avis sur les dossiers. Les études disponibles au cours de l'instruction réglementaire du maïs NK 603 et du ROUNDUP sont décrites plus en détail dans les annexes relatives à l'historique d'évaluation de ces dossiers (annexes 3 et 4).

Ces études réglementaires ne sont pas toujours publiées dans la littérature scientifique. Mais par ailleurs, d'autres équipes de recherche conduisent des protocoles sans lien direct avec l'autorisation initiale des produits. Ces travaux sont disponibles par le biais de publications dans des revues scientifiques avec comité d'évaluation. Un inventaire des publications scientifiques utiles pour éclairer les questions posées par l'étude de Séralini *et al.* (2012) a été dressé.

3.2.1 Recherche bibliographique des études pertinentes dans le cadre de cette saisine sur les plantes génétiquement modifiées

La question de l'évaluation des risques liés aux plantes génétiquement modifiées a fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques de synthèse. Une revue récente, parue dans le journal « *Environnement international* » en février 2011 a été réalisée par J.L. Domingo et Giné Bordonaba (Domingo et Giné Bordonaba 2011). Cette synthèse décrit la diversité des protocoles utilisés qui ne sont pas systématiquement conduits selon les recommandations de la littérature scientifique internationale (Domingo 2007). Ces protocoles d'évaluations recensés peuvent s'étaler sur des durées variées (de 28 jours à 104 semaines), exploitent des modèles animaux variés (rat, souris, poulet, macaques,...) et s'intéressent au suivi de paramètres très différents (croissance des animaux, effets pathologiques, paramètres biochimiques,...). Cette synthèse conclut que le nombre de publications spécialement dédiées à l'évaluation des risques liés aux OGM reste limité. Cependant, elle insiste sur le fait que pour la première fois, il semble s'établir un équilibre entre le nombre d'auteurs qui affirment sur la base de leurs études que les plantes génétiquement modifiées étudiées sont aussi sûres et de mêmes propriétés nutritionnelles que leurs homologues obtenues par sélection naturelle et ceux qui émettent un certain nombre de réserves. Cette synthèse ne porte aucun regard critique sur les interprétations des auteurs cités, certaines ont pourtant fait l'objet de réserves de la part du monde scientifique. Elle précise, par ailleurs, que les études publiées allant dans le sens de la sécurité des PGM ont été souvent conduites pour le compte d'entreprises qui commercialisent ces plantes.

Un nombre important des études décrites dans cette publication sont des essais dit de toxicité sub-chronique par administration *via* l'alimentation pendant 90 jours du produit à tester, en l'occurrence une partie de la plante génétiquement modifiée. Ces tests ont pour objectif d'évaluer le potentiel toxique des plantes GM et la sécurité de leur consommation sub-chronique. Ces études se basent sur le protocole OCDE 408 qui permet de tester la toxicité sub-chronique des produits chimiques chez les rongeurs. On recense une vingtaine de publications (annexe 5) dans la littérature scientifique. La plupart de ces études sont réalisées par les industriels ou par des sociétés de recherche sous contrat (CRO) à la demande des industriels et correspondent aux études présentées dans les dossiers de demande d'autorisation, comme celle de Hammond *et al.* (Hammond *et al.* 2004) pour le dossier NK603.

Pour les $\frac{3}{4}$, les plantes GM testées sont des PGM de première génération, c'est-à-dire résistantes à des insectes et/ou tolérantes à des herbicides. Les groupes d'animaux comportent entre 10 et 20 animaux, il s'agit pour les $\frac{3}{4}$ de rats de la lignée Sprague Dawley. Les taux d'incorporation dans les régimes des animaux varient suivant l'espèce végétale testée. Il est souvent au maximum de 30 % pour le maïs et peut atteindre 60 % pour le riz. Selon les auteurs, aucune de ces études n'a conduit à la mise en évidence d'effet néfaste pour la santé.

Une autre revue bibliographique, parue en 2011 dans la revue « *Food and Chemical Toxicology* » (Snell *et al.* 2012) s'intéresse plus particulièrement à « l'effet sanitaire des plantes génétiquement modifiées dans les essais à long terme et multi-générationnels ». Elle décrit ainsi douze études « long terme » recensées et douze études multi-générationnelles. Le descriptif de ces études « long terme » confirment la variété au niveau des protocoles, des espèces et des résultats, observée par (Domingo et Giné Bordonaba 2011) sur l'ensemble des études. Elles concernent une large gamme d'espèces (rat, souris, vache laitière, saumon, macaques) et le temps d'observation varie de 26 à 104 semaines pour des espèces ayant des durées de vie variables. Ces études concernent très majoritairement des sojas tolérants au glyphosate et aucune n'a été menée sur du maïs NK 603. Les auteurs de cette synthèse concluent :

- que ces 24 études ne suggèrent aucun danger particulier et que si des différences sont parfois observées entre les animaux contrôles et les animaux nourris avec les PGM étudiées celles-ci s'inscrivent dans la gamme des variations biologiques naturellement observées entre les individus de l'espèce. D'après les auteurs, elles ne mettent pas en évidence un effet toxique des OGM,
- qu'aucune de ces études ne décrit des observations qui nécessiteraient de fournir des informations complémentaires aux études de toxicité subchronique pendant 90 jours sur les rongeurs définies par la guideline 408 de l'OCDE (OECD 1998). Les études de toxicité subchronique pendant 90 jours seraient suffisantes pour servir de base à l'évaluation réglementaire des OGM. Cependant, il n'est pas à exclure que des études à long terme doivent être conduites au cas par cas pour l'évaluation réglementaire si des doutes raisonnables persistent après examen de l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours.

Protocole de la recherche bibliographique des études pertinentes dans le cadre de cette saisine et concernant le maïs NK 603

Compte tenu des questions posées, la recherche bibliographique s'est concentrée sur l'identification de l'ensemble des études portant sur le maïs NK 603. Elle a été étendue à l'ensemble des plantes génétiquement modifiées porteuses du gène CP4*epsps*, et aux études « long terme » portant sur l'ensemble des plantes génétiquement modifiées.

Cette recherche vise à vérifier l'existence d'éventuelles nouvelles publications susceptibles de nourrir la réflexion non référencées dans les précédentes synthèses. La recherche a été réalisée sur deux bases de données (Scopus® et Medline) selon des mots clés.

Ces résultats ont été comparés avec les références citées dans les revues bibliographiques de synthèse (Domingo et Giné Bordonaba 2011; Snell *et al.* 2012) et le fonds bibliographique de l'Anses sur cette question. Il n'a pas été identifié de nouvelles publications non recensées, à l'exception de la publication de Séralini *et al.* à l'origine de la présente saisine.

Seules, deux études, conduites sur un délai proche de l'espérance de vie moyenne des animaux concernés, employant une PGM résistante au glyphosate (soja) et pouvant à ce titre être comparées à celle de Séralini *et al.* (2012) ont été retenues. Il s'agit des études de Sakamoto *et al.* (Sakamoto *et al.* 2008) et Malatesta *et al.* (Malatesta *et al.* 2008). L'Anses a fait réaliser une traduction anglaise de la publication de (Sakamoto *et al.* 2008) éditée en japonais.

3.2.2 : Recherche bibliographique des études pertinentes dans le cadre de cette saisine pour les préparations à base de glyphosate

De nombreuses études ont été examinées dans le cadre de l'examen du dossier de la substance active glyphosate, en vue de son inscription à l'annexe 91/414/CE, et des dossiers de demandes d'autorisation de mise sur le marché pour les préparations phytopharmaceutiques contenant cette substance. L'annexe 3 résume les données prises en compte, dont quelques unes, issues de la littérature, ont été produites par le NTP (National Toxicology Program).

Compte tenu des questions posées, la recherche bibliographique s'est concentrée sur l'identification de l'ensemble des études portant sur les préparations à base de glyphosate. Elle a été étendue également au glyphosate, aux co-formulants associés dans les préparations ROUNDUP, et aux études à long terme. Cette recherche vise à vérifier l'existence d'éventuelles nouvelles publications susceptibles de nourrir la réflexion non référencées dans les précédentes synthèses. La recherche a été réalisée sur deux bases de données (Scopus® et Medline) selon des mots clés (ROUNDUP, glyphosate, long term studies, 104-week study, toxicity).

En ce qui concerne plus spécifiquement les études à long terme (de durée égale ou supérieure à un an), il n'est pas rapporté dans la littérature scientifique d'expériences réalisées sur le ROUNDUP GT PLUS, ni avec d'autres préparations à base de glyphosate, ni avec le co-formulant présent dans la préparation ROUNDUP GT PLUS.

3.3 Etude critique des études à long terme les plus pertinentes

3.3.1 Description des études

3.3.1.1 L'étude de Malatesta *et al.*

3.3.1.1.1 Objectif et protocole expérimental

L'étude de Malatesta *et al.* (Malatesta *et al.* 2008) a pour but d'étudier les effets hépatiques d'une alimentation contenant 14 % de soja génétiquement modifié (événement CP4 EPSPS) traité par le ROUNDUP chez des souris Swiss femelles pendant 2 ans (10 souris par groupe). Il ne s'agit pas d'une étude de toxicité réglementaire mais d'une étude à vocation de recherche, qui en conséquence n'entre pas dans le champ des lignes directrices OCDE. Ce travail repose sur une étude protéomique réalisée afin de déterminer si l'alimentation GM entraîne des modifications protéiques au niveau du foie et sur des paramètres de nature morphologique et cellulaire. Dans ce cadre, le nombre de souris, 10 souris femelles par groupe, apparaît comparable à d'autres publications ayant le même objectif.

3.3.1.1.2 Résultats

Selon les auteurs, l'alimentation GM n'a pas entraîné de différence significative concernant la mortalité et le poids des animaux ou de leur foie. De plus, aucune altération macroscopique, ni lésions pathologiques et apparition de tumeur n'ont été observées sur les organes des souris. Au niveau protéique, il n'a pas été relevé de différence concernant la teneur globale en protéine hépatique et le nombre de protéines identifiées qui reste stable (autour de 1400). Toutefois l'analyse protéomique a mis en évidence 49 protéines différemment exprimées chez les souris ayant reçu le soja GM, dont 39 augmentées et 10 diminuées. Vingt de ces protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse et sont des protéines impliquées dans le métabolisme hépatocytaire, la réponse au stress, la voie du calcium et la fonction mitochondriale. Au niveau morphologique, les auteurs rapportent des modifications nucléaires et mitochondriales qui n'apparaissent qu'après la première année. Les auteurs concluent à une influence du soja GM sur la capacité métabolique des hépatocytes et le processus de vieillissement. Ils soulignent l'importance de mener des recherches sur les effets à long terme d'une alimentation contenant des OGM.

3.3.1.2 L'étude de Sakamoto *et al.*

3.3.1.2.1 Objectif et protocole expérimental

Sakamoto *et al.* (Sakamoto *et al.* 2008) ont évalué la sécurité à long terme d'un soja génétiquement modifié (événement CP4 EPSPS) chez des rats F344 soumis à un régime contenant 30 % de ce soja pendant 2 ans. Trois groupes de rats ont été constitués. Ils ont reçu respectivement un régime contenant 30 % de soja génétiquement modifié (50 rats/sexe), un régime contenant 30 % de soja quasi-isogénique (50 rats/sexe), un régime standard sans soja (35 rats/sexe). Parmi les études de toxicité à long terme relevées dans la littérature, celle de Sakamoto *et al.* est celle qui se rapproche le plus d'une étude réglementaire. La plupart des recommandations du protocole OCDE 453 ont été respectées, en particulier en ce qui concerne le nombre important d'animaux (50/groupe).

3.3.1.2.2 Résultats

En fin de l'étude, les auteurs n'ont pas relevé de différence liée au soja GM concernant le taux de survie, le poids des rats ou la consommation de nourriture. Certains paramètres hématologiques

(hémoglobine, hématoците, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine) sont significativement diminués dans le groupe GM comparé au groupe non GM, mais ces variations sont toutes inférieures à 4 % et n'ont pas de signification biologique. Les seules modifications biochimiques (transaminases, créatinine) et de poids des organes concernent les traitements soja *versus* régime standard. Les seules différences significatives au niveau de l'apparition de tumeurs néoplasiques sont observées également chez les animaux ayant reçu un régime soja *versus* régime standard. En conclusion, cette étude montre que le soja GM administré pendant 2 ans à des rats F344 n'entraîne pas de modifications significatives comparé au soja non GM. En revanche, une alimentation à base de 30 % de soja pourrait présenter des effets potentiellement délétères.

3.3.1.3 L'étude de Séralini *et al.*

3.3.1.3.1 Objectif et protocole expérimental

L'étude de Séralini *et al.* (2012) a pour objectif d'étudier sur des rats, la toxicité à long terme du ROUNDUP GT PLUS et d'un maïs tolérant au glyphosate *via* l'alimentation. Le maïs tolérant au glyphosate étudié comporte l'événement de transformation NK603.

Dix groupes de 10 rats de chaque sexe ont été nourris pendant 2 ans avec un régime contenant soit :

- 33 % de maïs non GM (groupe témoin),
- 11, 22 ou 33 % de maïs NK603 non traité au ROUNDUP WEATHER MAX,
- 11, 22 ou 33 % de maïs NK603 traité au ROUNDUP WEATHER MAX,
- 33 % de maïs contrôle et une eau de boisson contenant 3 doses différentes de ROUNDUP GT PLUS.

Les auteurs ont suivi la mortalité des rats et l'incidence des tumeurs dans chaque groupe. Ils ont réalisé des coupes histologiques et de la microscopie électronique sur les organes présentant une pathologie au cours de l'expérience. La publication présente une analyse statistique discriminante (OPLS-DA²⁶) des paramètres de biochimie sanguine et urinaire (mesurés à 15 mois) du groupe de femelles nourries avec 22 % de maïs NK603 non traité au ROUNDUP WEATHER MAX, et comparé au groupe témoin.

3.3.1.3.2 Résultats

Les auteurs décrivent une mortalité et une incidence des tumeurs plus précoces et plus importantes dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin pour les femelles et dans les groupes consommant des OGM pour les mâles. Les pathologies observées sont dépendantes du sexe avec une prédominance de tumeurs mammaires et d'anomalies hypophysaires chez les femelles, et de pathologies liées au foie, au tractus hépatodigestif et aux reins chez les mâles. Les images des coupes histopathologiques et de microscopie électronique illustrent ces résultats. Les teneurs en acides férulique et caféique des régimes des rats sont plus faibles dans les croquettes contenant les maïs NK603. Les données biochimiques du groupe femelle nourri avec 22 % de maïs NK603 non traité et du groupe contrôle sont analysées par une méthode statistique qui montre que les variables contribuant le plus à la discrimination entre les deux groupes concernent des paramètres rénaux. Les teneurs sanguines en œstrogènes sont modifiées. L'ensemble des résultats traduit selon les auteurs une toxicité alimentaire hormono-dépendante, non linéaire par rapport à la dose se traduisant par des effets différents pour chaque sexe.

²⁶ Orthogonal partial least squares-discriminant analysis

Le protocole de ces trois études est résumé dans le tableau ci-dessous :

	Séralini <i>et al.</i>	Sakamoto <i>et al.</i>	Malatesta <i>et al.</i>
PROTOCOLE			
Espèce et Souche	Rats Sprague Dawley	Rats F344	Souris Swiss
Durée de l'étude	2 ans	2 ans	2 ans
Nombre d'animaux/groupe/sexe	10	4 x 50 et 2 x 35	10
Nombre de groupes	20	6	2
Nombre total d'animaux	200	270	20
Sexe	Mâle et femelle	Mâle et femelle	Femelle
Matériel végétal	Maïs NK603	Soja ROUNDUP Ready	Soja 40-3-2
Transgène	2 gènes CP4-epsps	1 gène CP4-epsps	1 gène CP4-epsps
Protéine	2 protéines CP4-EPSPS	CP4-EPSPS	CP4-EPSPS
Traitement ROUNDUP des plantes	En fonction des lots	Non renseigné mais présence de résidu de glyphosate	Oui
Doses testées pour les différents groupes (abréviations utilisées dans le texte)	11 %, 22 %, 33 % de grains de maïs NK 603 non traités avec du ROUNDUP (% OGM) 11%, 22%, 33% de grains de maïs NK 603 traités au ROUNDUP WEATHER MAX (3 L/ha) (% OGM +R) 50ng/L (RA), 400mg/kg (RB), 2.25 g/L (RC) de ROUNDUP GT PLUS dans l'eau de boisson	30 % de soja	14 % de soja traité au ROUNDUP
Doses dans les groupes témoin	33 % quasi-isogénique	30 % quasi-isogénique Régimes sans soja	14 % soja commercial
Analyse de composition aliment/équilibre entre les lots	Oui mais non montrée Audition : Absence de mycotoxines (< LOQ)	Oui	Non
Age en début d'expérience	5 semaines	4 semaines	Age du sevrage
DONNEES RECOLTEES			
Présence du transgène dans le végétal	Oui	Oui	Non
Données de consommation	Non fournies	Oui	Non
Données de croissance	Non fournies	Oui	Non
Mortalité	Oui	Oui	Non
Poids des organes	Non	Oui	Seulement le foie
Examens anatomopathologiques	Oui Nombre et description peu précise des observations histopathologies	Oui Nombre et description précise des observations (lésions non néoplasiques, nombre de foyers hépatocellulaires, néphropathies, lésions néoplasiques) Histopathologies	Non

	<i>Séralini et al.</i>	<i>Sakamoto et al.</i>	<i>Malatesta et al.</i>
Autres examens	Microscopie électronique		Examens réalisés sur le foie : Protéomique Microscopie électronique Morphométrie cellulaire Immunohistochimie
Fréquence de tumeurs	Oui	Oui	Pas de tumeurs observées
Délai d'apparition	Oui	Non	
Paramètres biochimiques	Oui (hématologie, biochimie sanguine et urinaire)	Oui (hématologie, biochimie sanguine)	Non
Poids des organes	Non fourni	Oui (8 chez mâles et 9 chez femelles)	Oui (foie)
Hormones stéroïdiennes	Oui dans le sang	Non	Non
Analyse de comportement/suivi clinique	2 fois par semaine : observation et palpation, enregistrement des signes cliniques.	Observation journalière	Non
Tests ophtalmologiques	Oui	Non	Non
Traitement statistique de données	Pas de test statistique sur les différences entre traitements pour la mortalité et l'incidence des pathologies. Analyse discriminante basée sur la méthode OPLS pour les données biochimiques. Pas d'estimation des effets OGM doses/sexe/ROUNDUP ni de calcul d'intervalles de confiance sur ces effets.	Analyse statistique conforme aux recommandations de l'OCDE (comparaison de moyenne et de fréquence, calculs des intervalles de confiance) Sur croissance, consommation, poids des organes, données biochimiques et hématologiques T test de Student pour comparer OGM à non GM	Tests de différence OGM/Témoin sur la protéomique

3.3.2 Analyse critique des études

3.3.2.1 L'étude de Malatesta et al.

Il s'agit d'une étude originale qui vise à évaluer des effets des OGM sur des paramètres non standard mettant en œuvre des techniques sophistiquées (protéomique et microscopie électronique). Dans cette étude, le soja administré au groupe contrôle est mal défini et ne correspond pas au soja quasi-isogénique non transgénique. De plus, il n'existe pas de groupe ayant reçu un soja GM non traité avec l'herbicide qui aurait pu permettre de discriminer des effets liés à ce dernier. L'analyse est centrée uniquement sur la recherche de modifications hépatiques. Cette étude montre les effets d'une alimentation à base de soja GM pendant 2 ans sur des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des hépatocytes. Toutefois, les paramètres biochimiques du sang et des urines classiquement mesurés pour traduire en toxicologie des effets néfastes sur cet organe ne sont pas présentés.

Au final, malgré les différences observées au niveau moléculaire et cellulaire, les souris Swiss exposées pendant 24 mois à une alimentation contenant 14 % de soja GM traité par le ROUNDUP ne présentent pas de signes laissant supposer un processus de cancérogenèse. Cependant, cette étude a été réalisée sur une lignée de souris (Swiss) connue dans la littérature pour développer très peu de tumeurs (annexe 6).

3.3.2.2 L'étude de Sakamoto et al.

Cette étude est la plus proche d'un protocole standard de cancérologie chez le rat et met en œuvre le nombre d'animaux recommandé pour ce type d'étude. On peut reprocher à cette étude l'absence

de mesures de paramètres de la fonction rénale et l'absence de précision sur les délais d'apparition des tumeurs.

Sur le plan expérimental, il n'est pas précisé si le soja GM a été traité ou non par une préparation à base de glyphosate. Toutefois, les traces (0,1 ppm) de glyphosate détectées dans ce soja le laisse supposer (Sakamoto *et al.* 2007). Si c'est le cas, l'absence d'un groupe GM sans traitement avec une préparation à base de glyphosate en plus des autres groupes est comme dans la publication précédente regrettable. En matière d'analyse statistique, les méthodes mises en œuvre sont conformes aux recommandations de l'OCDE avec des comparaisons de moyenne et de fréquence des observations et un calcul des intervalles de confiance dans l'objectif de comparer le groupe nourri au soja GM aux groupes témoin (soja non GM et sans soja). Au final, aucune différence ayant une signification biologique et pouvant traduire un effet néfaste lié à la modification génétique du soja n'est observée entre les différents groupes de rats.

3.3.2.3 L'étude de Séralini *et al.*

Compte tenu de l'objet de la saisine cette étude a fait l'objet d'une analyse détaillée.

3.3.2.3.1 Protocole

Une étude large

L'étude de Séralini *et al.* (2012) est une étude conduite dans un cadre de recherche expérimentale qui n'a pas spécialement vocation à être comparée strictement aux études conduites dans un cadre de l'autorisation d'un produit ou d'une substance (études réglementaires). Domingo *et al.* (Domingo 2007) confirment qu'un certain nombre de publications en matière d'OGM sont basées sur des études qui ne suivent pas les lignes directrices préconisées dans le cadre de ces études réglementaires.

Dans le cadre de tels protocoles de recherche, l'étude de Séralini *et al.* (2012) est une étude ambitieuse conduite en mobilisant de larges moyens. Cette étude est à souligner du fait de son originalité ; en effet très peu de publications relatent des travaux portant à la fois sur les effets à long terme des OGM et l'herbicide pour lesquels ils sont tolérants.

Cette étude présente la particularité de tester parallèlement sur cette longue période et à plusieurs doses une PGM traitée et non traitée par un produit phytopharmaceutique ainsi que la formulation phytopharmaceutique complète seule. A ce titre, il n'a pas été trouvé d'équivalent dans la littérature. Elle se caractérise également par le suivi d'un nombre important de paramètres sanguins et urinaires et le fait que les auteurs indiquent qu'elle a été conduite dans un environnement BPL²⁷.

Les principales critiques formulées jusque là par diverses instances concernent notamment le manque d'informations accessibles dans la publication concernant la composition des aliments et le type de régimes testés, le choix des doses, la souche de rats utilisée, le nombre de rats par lot et le traitement statistique des données.

Des informations manquantes

Lors de l'audition, l'équipe de M. Séralini a apporté des réponses à un certain nombre d'interrogations relatives à des données n'apparaissant pas formellement dans la publication. Des informations manquantes ou des garanties ont été recueillies notamment sur :

- Les périodes et le nombre des traitements phytopharmaceutiques au ROUNDUP WEATHER MAX et à d'autres produits phytopharmaceutiques des maïs cultivés pour cette étude,
- La composition chimique des grains et leurs teneurs en mycotoxines, glyphosate et ses résidus,
- La composition des régimes alimentaires et le fait que les rations des rats des groupes 11 et 22 % ont bien été complétées avec du maïs quasi-isogénique pour atteindre 33 % de maïs dans la ration,

²⁷ La revendication du statut BPL dans le cas de l'étude publiée par Séralini *et al.* (2012) suppose l'application des principes énoncés dans ce document OCDE ENV/JM/MONO(2002) traitant le cas particulier des études mettant en jeux des sites multiples.

- Le mode de conservation des aliments.

Le choix des doses

En ce qui concerne les doses d'administration d'OGM dans la ration, 11 %, 22 % et 33 %²⁸, le protocole expérimental adopté est complet et standard. Ces doses (11 et 33 %) correspondent aux doses habituellement mises en œuvre dans les études réglementaires de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat.

En revanche, le choix des teneurs de ROUNDUP GT PLUS administrées dans l'eau de boisson des rats pose deux types de questions. La première concerne l'échelle de variation entre les trois doses testées qui vont de 50 ng/L à 2,5 g/L soit un facteur multiplicatif de l'ordre de cinquante millions. L'écart entre les doses fortes et la faible dose est ainsi trop important pour pouvoir conclure à une quelconque relation dose effet.

La seconde question porte sur la significativité de ces trois doses en termes d'exposition du consommateur ou d'utilisateur de préparations à base de glyphosate.

Les trois niveaux de concentration testés dans cette étude ont été comparés aux données d'exposition disponibles :

- La première dose testée correspond à un niveau que l'auteur qualifie de contamination de l'eau du robinet en glyphosate : 50 ng/L. La norme réglementaire en France est de 100 ng/L au maximum dans l'eau de consommation. Pour les eaux distribuées, sur 43741 analyses recherchant le glyphosate (périodes 2007-2009)²⁹ seules 95 (0,2 %) permettent de retrouver des teneurs quantifiables en glyphosate. Ces résultats quantifiables sont retrouvés dans un nombre limité de stations de distribution (entre 0,2 et 0,4 % des 21864 stations testées). La teneur de 50 ng/L est donc une valeur réaliste pouvant potentiellement être observée mais sur un nombre très limité de stations françaises. Par ailleurs, ces données analytiques ne concernent que le glyphosate et non l'association glyphosate-co-formulants. Le co-formulant du ROUNDUP GT PLUS n'est pas mobile dans le sol (Koc = 2500 à 9600, DT50 sol = 1-2 jours)³⁰. La probabilité de le retrouver aux quantités testées dans les eaux souterraines apparaît négligeable.
- La deuxième dose testée correspond à un niveau que l'auteur qualifie de contamination "équivalente" à la LMR américaine pour le glyphosate dans des aliments génétiquement modifiés destinés à l'alimentation animale (soit 400 mg/kg). Au niveau européen (source : site de la DG Sanco), la LMR du glyphosate est fixée à 0,1 mg/kg pour le maïs doux (en tant que légumes-fruits) et à 1 mg/kg pour le maïs en tant que graine de céréale. Donc, le niveau auquel est exposé le consommateur européen est très inférieur à celui testé dans ce protocole. En outre, comme pour les eaux de boisson, le co-formulant n'étant pas systémique, le consommateur sera majoritairement exposé au glyphosate et non au mélange glyphosate + co-formulant.
- La troisième dose testée correspond à un niveau que l'auteur qualifie de « la moitié de la dose appliquée prescrite en glyphosate » (2,25 g/L). En tenant compte de la concentration du glyphosate dans la préparation (ROUNDUP GT PLUS), de la dose à appliquer par hectare (données de la base e-phy du Ministère chargé de l'agriculture) et de la dilution recommandée par le fabricant, la concentration en glyphosate de la « bouillie » appliquée serait de l'ordre de 7 g/L, soit le même ordre de grandeur que la dose testée dans la publication. Toutefois, l'utilisateur sera exposé essentiellement par voie cutanée et potentiellement par inhalation à la préparation ROUNDUP GT PLUS diluée. La voie d'administration (voie orale) décrite dans le protocole de l'étude n'est donc pas la plus adaptée pour l'évaluation des risques lors de l'application du produit.

²⁸ La dose de 33 % correspond, rapporté à l'homme, à une dose journalière de l'ordre de 40 fois supérieure aux consommations moyennes de maïs. La société Monsanto indique une proportion de 84 fois supérieure dans sa contribution écrite.

²⁹ Source : base Sise-eaux du Ministère chargé de la santé

³⁰ JP Giesy, S Dobson and KR Solomon (2000) Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 167:35-120

Nombre de rats et souche de rats utilisée

Les auteurs de cette étude dans le cadre de leur audition ont rappelé qu'un des objectifs initial de l'étude était d'évaluer le caractère prédictif des études de toxicité subchronique pendant 90 jours sur l'apparition d'effets plus tardifs.

Dans ce cadre, il apparaît pertinent de choisir des rats Sprague Dawley qui sont ceux les plus fréquemment utilisés dans le cadre de ce protocole³¹ et le choix de dix rats par groupe est légitimé puisqu'il est couramment utilisé dans le cadre des études de toxicité subchronique.

Il convient à ce propos de noter que le nombre de rats par lot est un facteur déterminant dès lors que l'on veut prouver l'innocuité d'un produit (études réglementaires) car il conditionne la puissance des tests et donc la probabilité de détecter un effet. Le faible nombre d'animaux par lot constitue un risque pour l'auteur de ne pas être à même de trouver de différences statistiquement significatives entre les lots et d'avoir ainsi conduit une étude ne permettant pas de conclure, compte tenu de la durée de l'étude, 2 ans³² au lieu de 90 jours et de la sensibilité de cette souche de rats.

Les données de la littérature sur les rats Sprague Dawley (annexe 6) montrent dans des lots témoins des mortalités élevées et de fortes incidences de tumeurs mammaires qui correspondent aux principales anomalies observées par Séralini *et al.* (2012). Cette caractéristique phénotypique aurait du être prise en compte dans le calcul du nombre d'animaux nécessaire.

Taille et nombre de lots témoin

Une critique importante tient au caractère unique et à la taille réduite des lots contrôles mâles et femelles qui réduisent significativement les possibilités d'interprétation de cette étude. L'auteur de l'étude a lui-même convenu au cours de son audition que ce point était regrettable.

3.3.2.3.2 Résultats et discussion

Pour mémoire les auteurs décrivent notamment pour les femelles dans tous les groupes traités une mortalité plus précoce et plus élevée et une apparition de tumeurs « globalement »³³ plus précoces et plus importantes. Ils décrivent pour l'ensemble des mâles traités aux OGM des lésions hépatiques.

La critique majeure des résultats de l'étude tient à l'absence d'analyse statistique des données concernant ces affirmations.

Les auteurs constatent simplement que les lots traités sont globalement plus affectés que le lot contrôle sans jamais tester l'hypothèse que ces résultats puissent être dus au hasard. Les auteurs interrogés sur ce point indiquent avoir simplement voulu rendre compte de leurs résultats qui leur apparaissaient troublants non pas sous forme d'une analyse statistique mais sous forme d'un descriptif comme pratiqué en clinique humaine.

« L'équipe de Gilles-Éric Séralini ajoute que cette étude correspond à un protocole recherche et n'a rien à voir avec un protocole de test réglementaire. Les résultats portent de façon factuelle, à la fois sur les tumeurs et sur la mortalité. L'équipe n'a pas souhaité faire d'analyses statistiques sur ce point, car elle sait très bien qu'avec 10 rats par groupe, les puissances de tests ne sont pas suffisantes. Ceci avait été reproché par l'équipe à l'étude de Monsanto. Gilles-Eric Séralini précise que des statistiques très poussées ont été par contre conduites sur les paramètres biochimiques confirmant les perturbations pouvant conduire aux pathologies observées. » (Extrait du verbatim de l'audition des auteurs de la publication)

Suite à l'audition, l'Anses a demandé à M. Séralini la communication de l'ensemble des données brutes de l'étude. Les auteurs n'ont pas accédé à cette demande globale (Cf. audition) mais ont

³¹ Les protocoles OCDE 452 et 453 ne sont pas prescriptifs en ce qui concerne la souche de rat à utiliser et si le Fischer 354 est souvent utilisé en cancérologie, essentiellement parce qu'il s'agit de la souche la mieux connue, la souche Sprague Dawley est d'ailleurs en cours d'évaluation par le National Toxicology Program (NTP).

³² Deux ans correspondant à la durée de vie moyenne d'un rat, un pourcentage important d'animaux est susceptible de mourir avant la fin des études à long terme.

³³ « almost always more often »

fourni des données chiffrées sur la mortalité et l'apparition de tumeurs non régressives. Le GECU a pu utiliser en partie ces données (sur la mortalité) ainsi que celles accessibles dans la publication (figure 1 et tableau 2) afin de statuer sur le caractère significatif ou non de certains résultats.

Dans le but d'augmenter la probabilité de détecter des effets, le GECU a réalisé, dans un premier temps, des tests unilatéraux³⁴ en considérant des risques de 1^{ère} espèce³⁵ de 5 % sans tenir compte de la multiplicité des tests. Cette approche augmente la puissance de l'analyse statistique mais augmente également le risque de faux positifs (fausse découverte). Il s'agit d'un traitement statistique considéré comme étant le plus favorable afin de faire émerger le maximum d'effets qui doivent être confrontés à une interprétation biologique. Les tests statistiques ont, dans un deuxième temps, été corrigés de manière à limiter les risques de fausse découverte (ajustement ou analyse FDR : False discovery rate)³⁶ (Benjamini et Hochberg 1995). En effet, la réalisation de multiples tests statistiques sur un même jeu de données augmente rapidement l'erreur de première espèce, c'est-à-dire la probabilité d'observer des différences faussement significatives.

Trois séries de tests statistiques ont été réalisées par le GECU :

La première série de tests statistiques a pour objectif de déterminer s'il existe des différences significatives de mortalité en fin d'étude entre les groupes de rats témoin et les groupes de rats³⁷ OGM et/ou ROUNDUP. Ces tests permettent de choisir entre l'hypothèse nulle H0 "Taux de mortalité dans le groupe contrôle = Taux de mortalité dans le groupe OGM et/ou ROUNDUP" et l'hypothèse alternative A "Taux de mortalité dans le groupe contrôle < Taux de mortalité dans le groupe OGM et/ou ROUNDUP". Cette série de tests est réalisée à partir des histogrammes présentés dans la figure 1 de l'étude de Séralini *et al.* (2012). Le risque d'erreur de 1^{ère} espèce (probabilité de rejeter à tort H0) a été calculé en réalisant des tests exacts de Fisher avec 2 rats morts sur 10 dans le groupe contrôle femelle et 3 rats morts sur 10 dans le groupe contrôle mâle. Les résultats (Tableau 1) montrent que les différences de taux de mortalité sont significatives à 5 % avant correction (FDR) pour deux groupes de rats sur 18 :

- pour le groupe femelles, OGM à la dose 22 %,
- et pour le groupe femelles, OGM +R à la dose 22 %.

Lorsque l'on tient compte de la multiplicité des tests (FDR), aucune différence n'est significative.

Tableau 1. Résultats des tests statistiques (P=probabilité de l'erreur de 1^{ère} espèce) sur les taux de mortalité. *Les valeurs de P n'ont pas été corrigées pour tenir compte de la multiplicité des tests. Si ces corrections sont appliquées, aucune différence n'est significative.*

Groupes	Mâles		Femelles	
	Taux de mortalité	Valeur de P	Taux de mortalité	Valeur de P
Témoin	3/10	NA	2/10	NA
GMO 11 %	5/10	0,3250	3/10	0,5
GMO 22 %	1/10	0,9567	7/10	0,0349
GMO 33 %	1/10	0,9567	4/10	0,3142
GMO 11 %, R	4/10	0,5000	4/10	0,3142
GMO 22 %, R	5/10	0,3250	7/10	0,0349
GMO 33 %, R	3/10	0,686	4/10	0,3142
RA	3/10	0,686	5/10	0,1749
RB	4/10	0,5000	5/10	0,1749
RC	1/10	0,9567	4/10	0,3142

³⁴ Test qui préjuge du sens de la différence observée. Pour cette analyse, que les lots traités aux OGM ou au ROUNDUP sont susceptibles d'avoir des effets adverses mais pas d'effets positifs.

³⁵ Probabilité de rejeter à tort l'hypothèse H0, qui correspond à l'hypothèse d'absence de différence entre les groupes.

³⁶ Procédure qui permet de contrôler le risque de faux positifs lié au nombre élevé de tests réalisés sur les mêmes données.

³⁷ Doses testées dans les groupes :

11 %, 22 %, 33 % de grains de maïs NK 603 non traités avec du ROUNDUP (% OGM)

11%, 22%, 33% de grains de maïs NK 603 traités au ROUNDUP WEATHER MAX (3 L/ha) (% OGM +R) 50ng/L (RA), 400mg/kg (RB), 2.25 g/L (RC) de ROUNDUP GT PLUS dans l'eau de boisson

La deuxième série de tests a pour objectif de déterminer si les rats appartenant à l'un des groupes OGM et/ou ROUNDUP meurent plus précocement que les rats du groupe témoin. Le test du Log-Rank a été utilisé dans ce but par le GECU. Ce test compare les probabilités de survie entre les différents groupes. Trois séries de comparaisons ont été réalisées successivement : Témoin vs OGM seul, Témoin vs OGM traité au ROUNDUP WEATHER MAX, Témoin vs ROUNDUP GT PLUS. Les tests ont été réalisés avec et sans ajustement (ajustement Sidak) sur le nombre de comparaisons effectuées par série à partir des données brutes de mortalité fournies par l'auteur suite à son audition. Les résultats (Tableau 2) montrent qu'il existe deux différences significatives sur 18 avec les tests non ajustés :

- pour le groupe femelles, OGM à la dose 22 %,
- et pour le groupe femelles, OGM+R à la dose 22 %.

Si l'on tient compte de l'ajustement, aucune différence n'est significative.

Tableau 2. Résultats des tests du log-rank sur la réduction de l'espérance de vie avec et sans ajustement pour la multiplicité des tests.

Comparaisons		Mâles		Femelles	
		Non ajusté	Ajusté (Sidack)	Non ajusté	Ajusté (Sidack)
GMO 11 %	Témoin	0,661	0,9999	0,4522	0,9956
GMO 22 %	Témoin	0,2357	0,911	0,0159	0,1341
GMO 33 %	Témoin	0,0907	0,5751	0,122	0,6899
GMO 11 %, R	Témoin	0,4797	0,9972	0,3233	0,9702
GMO 22 %, R	Témoin	0,8953	1	0,0448	0,3378
GMO 33 %, R	Témoin	0,7233	1	0,4666	0,9965
RA	Témoin	0,5778	0,9996	0,0841	0,5464
RB	Témoin	0,3179	0,968	0,239	0,9144
RC	Témoin	0,084	0	0,2501	0,925

La troisième série de tests a pour objectif de déterminer si la fréquence des pathologies est plus élevée dans les groupes OGM et/ou ROUNDUP que dans les groupes témoins. Ces tests permettent de choisir entre l'hypothèse nulle H0 "Fréquence de pathologie dans le groupe contrôle = Fréquence de pathologie dans le groupe OGM et/ou ROUNDUP" et l'hypothèse alternative A "Fréquence de pathologie dans le groupe contrôle < Fréquence de pathologie dans le groupe OGM et/ou ROUNDUP". Ces tests ont été réalisés à partir du tableau 2 de l'étude de Seralini *et al.* (2012) pour les six pathologies listées avec les six traitements OGM (trois doses d'OGM sans ROUNDUP + trois doses d'OGM avec ROUNDUP WEATHER MAX) et les trois traitements ROUNDUP GT PLUS. Le risque d'erreur de première espèce a été calculé pour chaque pathologie et chaque régime alimentaire séparément avec un test exact de Fisher. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Sur les 54 comparaisons, 5 sont significatives à 5 % avant correction FDR :

- les « pathologies hépatiques » décrites par l'auteur comme des congestions hépatiques, des taches macroscopiques ou des nécroses hépatiques au niveau microscopique
 - pour les mâles du groupe nourri avec 22 % d'OGM,
 - pour les mâles du groupe RB.
- les tumeurs mammaires
 - pour les femelles du groupe RB,
- les signes pathologiques des glandes mammaires (autres que tumeurs décrites par les auteurs comme des galactocèles et des hyperplasies mammaires)
 - pour les femelles du groupe RA,
 - pour les femelles du groupe RB.

Si l'on corrige les tests pour tenir compte de leur multiplicité, il n'y a plus de différence significative à 5 % après correction FDR.

Tableau 3. Résultats des tests statistiques (P = probabilité de l'erreur de 1^{ère} espèce) sur l'incidence des pathologies (pourcentages d'animaux atteints avec au moins une tumeur ou lésion anatomopathologique). Les probabilités n'ont pas été corrigées pour tenir compte de la multiplicité des tests. Si ces corrections sont appliquées, aucune différence n'est significative à 5 %.

Organs and associated pathologie	GMO 11 %	GMO 22 %	GMO 33 %	GMO 11 % + R	GMO 22 % + R	GMO 33 % + R	RA	RB	RC
Males, in liver	0,31	0,035	0,085	0,31	0,31	0,18	0,18	0,035	0,18
In hepatodigestive tract	0,5	0,33	0,5	0,5	0,5	0,33	0,07	0,18	0,67
Kidneys, CPN	0,5	0,33	0,09	0,33	0,5	0,5	0,19	0,33	0,67
Females, mammary tumors	0,33	0,33	0,18	0,5	0,33	0,07	0,07	0,02	0,07
In mammary glands	0,18	0,33	0,18	0,18	0,18	0,07	0,02	0,02	0,07
Pituitary	0,15	0,31	0,82	0,15	0,91	0,5	0,31	0,5	0,5

De façon générale, des informations plus précises sur les pathologies observées sont nécessaires pour conclure sur la signification biologique des résultats statistiques avant correction sur la multiplicité des tests telle que recommandée, notamment dans le rapport de l'Anses (ANSES 2011). Le GECU regrette notamment le manque de précisions dans les définitions des groupes de pathologies décrits dans la publication et le peu de données biochimiques utilisables. L'ensemble des résultats de l'analyse statistique montrent néanmoins que :

- L'augmentation de mortalité et la réduction de l'espérance de vie (tableau 1 et 2) observées sur les femelles du groupe OGM 22 % et OGM 22 % +R (avant correction) ne sont confirmées par aucune pathologie sous-jacente (tableau 3). Ce résultat interpelle et nécessiterait de disposer d'informations complémentaires sur la cause de la mort de chaque animal de ces lots pour l'interpréter.
- L'augmentation des pathologies mise en avant dans la publication n'est significative à 5 % (avant correction) que pour un faible nombre de traitements et s'avère difficile à interpréter biologiquement du fait de l'imprécision des définitions des pathologies.
- L'augmentation de l'incidence des pathologies hépatiques du groupe des « mâles OGM 22 % » (avant correction) ne se retrouve pas aux doses 11 et 33 % et n'est pas retrouvé non plus pour le groupe « mâles OGM 22 % + R ». Ce résultat ne semble pas cohérent car il apparaît à une seule dose intermédiaire et n'est pas retrouvé dans un lot nourri avec un même pourcentage de maïs OGM.
- L'augmentation des pathologies hépatiques observées chez les mâles pour la dose RB de ROUNDUP GT PLUS (avant correction) peut être cohérente par rapport à la LOAEL du glyphosate. Toutefois, les autres pathologies (tumeurs mammaires, galactocèles et hyperplasie mammaire) pour les femelles à la dose RB ne semblent pas en accord avec les données toxicologiques sur le glyphosate (études à long terme sur des rongeurs). Par ailleurs, on constate qu'aucun de ces effets ne se retrouve à la dose la plus élevée (RC). Ce constat n'est pas en faveur d'une cohérence biologique même si on peut imaginer que cette forte dose puisse interférer sur le comportement alimentaire des rats. Il serait important de disposer des données de consommation d'eau et d'aliments des animaux traités.
- L'augmentation significative de la fréquence de pathologie des glandes mammaires (hors tumeur) (tableau 3) observée à la plus faible dose de ROUNDUP GT PLUS (RA) (avant correction) interpelle le GECU et pourrait laisser supposer un effet non attendu à très faible dose. Toutefois, pour pouvoir conclure sur un effet biologiquement significatif, il est indispensable de disposer des données individuelles, des données biochimiques complètes, des données historiques du centre investigateur de la souche SD.

Conclusions sur les résultats

Les résultats significatifs obtenus avant correction ne présentent pas dans leur globalité de cohérence biologique. Il serait toutefois nécessaire de disposer des données biologiques sur les résultats pour se prononcer définitivement. A ce stade, compte tenu des informations fournies dans la publication, les experts du GECU considèrent que les interprétations des auteurs ne sont pas suffisamment étayées par les données présentées.

Les auteurs de la publication au cours de l'audition ont d'ailleurs admis que cette étude n'était pas conclusive à elle seule et que cette étude, certes perfectible, avait le mérite d'initier une voie intéressante de recherche.

« Les membres de l'équipe sont intimement convaincus que, en ayant mobilisé toutes les techniques, ce qu'ils ont observé n'était pas aléatoire. Certes, c'est perfectible, mais l'équipe a juste ouvert une voie, et il faut maintenant faire mieux collectivement. » « Pour l'équipe de Gilles-Éric Séralini, il y a une perturbation endocrine parce qu'il y a une perturbation du rapport testostérone/oestradiol et des hypophyses femelles en particulier. Ces expériences doivent être recommencées car c'est la première fois que des tests sont réalisés avec un pesticide dans son entier à faible dose » (Extraits du verbatim de l'audition des auteurs de la publication).

3.3.2.3.3 Hypothèses

Les hypothèses mécanistiques avancées par les auteurs ne sont pas étayées par des résultats et sont donc spéculatives. Il a néanmoins paru intéressant aux membres du GECU de discuter plus avant du bien fondé de ces hypothèses.

Plausibilité d'un effet perturbateur endocrinien et d'effets à faible doses

L'hypothèse avancée par Séralini *et al.* (2012) pour expliquer le développement de tumeurs mammaires chez les femelles est un mécanisme d'action relevant de la perturbation endocrinienne. Selon les auteurs, cette hypothèse repose sur :

- des variations des niveaux circulant d'œstradiol et de testostérone chez les animaux femelles des lots traités,
- l'apparition de tumeurs dans des tissus hormono-sensibles (glandes mammaires, hypophyse) des lots traités,
- les résultats de travaux antérieurs publiés par la même équipe faisant état d'effets *in vitro* du ROUNDUP sur l'aromatase (enzyme impliquée dans la synthèse d'œstradiol à partir de la testostérone), ou par d'autres auteurs (Romano *et al.* 2012; Romano *et al.* 2010; Walsh *et al.* 2000) rapportant les effets du ROUNDUP sur la stéroïdogénèse, la reproduction et le développement,
- des niveaux relativement faibles d'acides caféique et férulique mesurés dans les aliments fabriqués à base de maïs génétiquement modifié qui pourraient être à l'origine d'une perturbation endocrinienne,
- de courbes doses-réponses non monotones qui constitueraient une caractéristique de la perturbation endocrinienne.

Un examen attentif de la publication indique que cet argumentaire est insuffisamment étayé par les résultats présentés. En effet, si l'on en juge par la figure 5 et le tableau 3 qui font état des niveaux circulant chez les rates femelles à 15 mois, les valeurs rapportées ne permettent pas de conclure à un effet significatif des traitements, et, aucun lien n'apparaît entre les observations faites sur l'hypophyse et la glande mammaire. Il faut noter, par ailleurs, que les niveaux hormonaux chez les rates varient considérablement en fonction du cycle d'œstrus et du moment de prélèvement pendant la journée rendant délicate l'interprétation des données sans disposer des détails expérimentaux précis sur les conditions de prélèvement. Un examen d'autres hormones (e.g. prolactine, LH, FSH), de tissus sensibles aux hormones (testicules, ovaires, surrénales) ou d'activités enzymatiques impliquées dans la stéroïdogénèse aurait été nécessaire pour conclure. Si l'hypothèse d'une perturbation endocrinienne du ROUNDUP a déjà été évoquée dans la littérature (Romano *et al.* 2012; Romano *et al.* 2010), cet article n'apporte aucune preuve de ces effets. Enfin, sur la base des connaissances actuelles, il est difficile d'adhérer aux arguments avancés par Séralini *et al.* concernant un mécanisme de perturbation endocrinienne pour expliquer des effets (non avérés) d'une consommation de maïs NK603 non concomitante d'une exposition à une préparation à base de glyphosate, sur les tumeurs mammaires. Bien que la plupart des

perturbateurs endocriniens entraînent des effets ne correspondant pas à une courbe monotone, l'absence d'une relation dose-effet pour les lots « OGM » ou « OGM +R » ne peut en aucun cas être considérée comme la preuve d'une perturbation endocrinienne.

Plausibilité de l'effet des métabolites secondaires

Le maïs NK 603 contient en plus de sa « propre » EPSP synthase, une EPSP synthase d'origine bactérienne (codée par deux copies du gène CP4 EPSPS d'*Agrobacterium tumefaciens*). Cette enzyme bactérienne est tolérante au glyphosate et intervient très en amont de la voie dite « de l'acide shikimique » (annexe 7). Les auteurs avancent l'hypothèse de perturbations du métabolisme secondaire de la plante du fait de la modification génétique. La modification de la composition chimique de la plante GM est en effet à documenter dans le cadre des demandes d'autorisation. Chaque dossier doit pour cela comporter une analyse comparée de la composition chimique de la plante GM et de son témoin non génétiquement modifié.

Ainsi, des différences de teneur de certains métabolites secondaires, notamment phénoliques, sont notées et mises en avant par les auteurs. Ces métabolites pouvant avoir des effets protecteurs ou de perturbation endocrinienne.

Les données dont nous disposons dans l'article concernent deux types de molécules mesurées dans les régimes des rats (croquettes) : les phyto-œstrogènes de type isoflavone et deux phénylpropanoïdes : l'acide caféique et acide férulique. Les auteurs ont indiqué lors de l'audition qu'ils possédaient d'autres données concernant d'autres molécules (par exemple tocophérols), pas encore mises à la disposition de la communauté scientifique.

Concernant les isoflavones : les auteurs n'ont pas constaté de différences sur ces composés entre les régimes utilisés lors des expérimentations. Les teneurs en isoflavones dans le maïs sont très faibles (< ou << 100 µg/kg) (Kuhnle *et al.* 2009). Les isoflavones sont des molécules connues pour leur propriété de *modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes* (qui expliquent en grande partie leurs propriétés dites de « phyto-œstrogènes »). Elles sont caractéristiques de plantes alimentaires telles que le soja, cependant leur présence dans le maïs n'est pas quantitativement suffisante *a priori* pour expliquer un quelconque effet protecteur ou perturbateur endocrinien (AFSSA/AFSSAPS 2005)³⁸.

Les phénylpropanoïdes mesurés dans l'étude sont l'acide caféique et son homologue *O*-méthylé : l'acide férulique. Ce dernier est de loin le plus important en quantité dans le maïs (~ 90 % du contenu en phénols totaux, ~ 50 fois plus que l'acide caféique). L'acide férulique est un métabolite secondaire classiquement mesuré dans l'analyse comparée de composition chimique du maïs OGM et de son témoin avec d'autres composés (acide phytique, inhibiteurs de trypsine, vitamine E, acide coumarique et raffinose). Le maïs peut être qualifié de plante riche en acide férulique (acide férulique total de l'ordre de 1-3 acide férulique/kg de maïs poids sec) (Ridley *et al.* 2002) ; (De La Parra *et al.* 2007) (OCDE 2002). Les teneurs rapportées par les auteurs (et mesurées dans les régimes contenant 33 % de maïs), une fois extrapolées aux teneurs dans le maïs initial, sont en concordance avec les données de la littérature.

Dans le cas précis des maïs NK603, Ridley *et al.* (Ridley *et al.* 2002) ont analysé les deux types de maïs (NK603 vs contrôle non transgénique). Avec une teneur moyenne de 2 g/kg, la gamme s'étend de 1,5 à 2,5 g/kg (NK603) et de 1,7 à 2,3 g/kg (contrôle non transgénique). Il existe donc une variabilité naturelle de teneurs en acide férulique dans ce maïs de 40 % environ. En conclusion, la différence de 16-30 % telle que décrite dans la publication sur des lots d'aliments s'inscrit donc dans la variabilité « naturelle » de la teneur mesurée pour ce constituant dans le maïs.

³⁸ On pourra se référer au rapport conjoint AFSSA/AFSSAPS « *Sécurité et bénéfices des phyto-œstrogènes apportés par l'alimentation – recommandations* » 2005, consultable à l'adresse suivante :

<http://www.afssa.fr/Documents/NUT-Ra-Phytoestrogenes.pdf>.

On peut rappeler les recommandations qui sont un apport journalier maximal de 1 mg/kg de masse corporelle d'équivalent isoflavones chez l'Homme.

On peut noter le possible rôle protecteur (notamment hépatique) de l'acide férulique (et de nombreuses molécules apparentées) mis en évidence dans une série de travaux. Par exemple, l'effet protecteur évalué contre les tumeurs mammaires induites par le 7,12-diméthylbenz[*a*]anthracène chez le rat Sprague Dawley (Baskaran *et al.* 2010). Cependant, aucune donnée scientifique actuellement disponible dans l'étude de Séralini *et al.* ne peut appuyer un rôle protecteur de l'acide férulique alimentaire chez le rat, ni l'effet, supposé délétère, d'une diminution de l'ordre de 16-30 % de l'acide férulique comme elle est observée dans le cadre de l'étude. Plus généralement, le rôle d'une telle substance est difficile à évaluer du fait de propriétés biologiques pléiotropiques multiples pour lesquelles des potentialités chimiopréventives sont souvent avancées sans données épidémiologiques solides.

Il aurait été judicieux pour approfondir de telles hypothèses de l'effet de ces substances naturelles de disposer d'une étude de composition complète des maïs et des régimes (croquettes) comprenant les métabolites secondaires habituellement mesurés pour le maïs.

Conclusion partie 3.3

En conclusion, après examen critique des publications pertinentes dans le cadre de cette saisine, le GECU constate l'absence de publications relatives à des études toxicologiques à long terme sur des produits phytopharmaceutiques formulés et le nombre limité des publications sur les effets à long terme des PGM. La publication de Séralini *et al.* (2012) combine ces deux approches. Elle présente le défaut majeur d'avoir pour se faire réduit le nombre de lots témoin et d'animaux par lot. Leurs résultats en matière de mortalité et d'incidence de tumeurs sont présentés de manière descriptive mais ne font pas l'objet d'une analyse statistique. Les auteurs formulent ainsi des interprétations non soutenues par les données présentées. Les hypothèses de mécanismes proposées par l'équipe de Séralini *et al.* (2012) pour expliquer les résultats obtenus ne sont pas confortés par l'analyse du GECU.

Les deux publications à long terme sur PGM retenues par le GECU (Malatesta *et al.* 2008; Sakamoto *et al.* 2008) ne permettent pas de conclure à des effets des PGM comparables à ceux décrits par Séralini *et al.* (2012) (apparition de tumeurs ou de surmortalité des animaux). Il convient toutefois de préciser qu'il n'est pas possible d'extrapoler complètement les résultats de ces articles. En effet, ces études ne sont pas conduites sur des maïs, mais sur des sojas tolérants au glyphosate, tolérance obtenue comme pour NK603 par la synthèse d'une protéine CP4EPSPS. De plus, pour Malatesta *et al.* (Malatesta *et al.* 2008), l'étude est réalisée sur un nombre limité d'animaux, une autre espèce et un seul sexe (souris femelles).

3.4 Conclusions du GECU

L'étude de Séralini *et al.* (2012) est une étude ambitieuse, conduite en mobilisant de larges moyens et publiée dans une revue internationale reconnue en matière de toxicologie alimentaire. Cette étude est à souligner du fait de l'originalité des questions qu'elle soulève.

Toutefois, après examen, les experts du GECU considèrent que les conclusions avancées par les auteurs sont insuffisamment soutenues par les données présentées dans cette publication. Par ailleurs, les hypothèses sur les mécanismes d'action proposées pour expliquer les résultats obtenus par l'équipe de Séralini *et al.* (2012) ne sont pas confortées par l'analyse réalisée.

Par conséquent, les experts concluent que les résultats de l'étude tels que publiés aujourd'hui ne sont pas de nature à remettre en cause les conclusions des évaluations précédentes sur le maïs NK603 et sur l'herbicide ROUNDUP. Cette étude ne peut être considérée comme conclusive quant au risque sanitaire que pourraient présenter les aliments issus de plantes GM comportant l'événement NK603 et le ROUNDUP.

En revanche, les experts du GECU soulignent l'absence de travaux étudiant les effets potentiels à long terme de l'exposition à différentes formulations de préparations à base de glyphosate et le nombre limité de ceux portant sur les effets à long terme d'une consommation d'OGM.

Concernant la question relative à l'évolution des principes d'évaluation tant des OGM que des produits phytopharmaceutiques, le GECU considère que des recommandations sont prématurées et ne peuvent en aucun cas se fonder sur cette seule étude.

En matière d'OGM, les experts du GECU constatent l'amélioration progressive des référentiels d'évaluation de leur sécurité notamment le renforcement de l'approche basée sur l'équivalence en substance par la mise en œuvre d'études de toxicité subchronique sur animaux. Toutefois, la capacité des méthodes d'évaluation actuelle à détecter d'éventuels effets sur le long terme et la plausibilité de ces effets font débat dans la communauté scientifique. La rareté des études venant documenter ces effets constitue un frein à la clarification de ces interrogations. Le GECU estime que ces questions doivent être débattues, notamment au regard de la complexification croissante (modifications génétiques empilées) et prévisible des plantes génétiquement modifiées. Les experts du GECU considèrent donc nécessaire la conduite d'une réflexion approfondie quant aux possibilités d'évolution de ces principes d'évaluation en s'appuyant sur l'ensemble des travaux d'ores et déjà conduits au niveau national notamment par l'Anses, mais aussi au niveau international³⁹.

En matière de produits phytopharmaceutiques, la réglementation sur la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques n'exige pas d'études à long terme pour la préparation commerciale. Les effets cumulés peuvent notamment être appréhendés selon des méthodologies en cours de développement au niveau européen. Ces méthodologies sont aujourd'hui destinées à être mises en œuvre pour étudier les effets cumulés des substances actives présentes dans la même préparation, particulièrement chez les travailleurs exposés. Les experts du GECU considèrent qu'il serait approprié d'appliquer ces méthodologies aux co-formulants, notamment ceux pour lesquels, en raison de leurs propriétés, des valeurs toxicologiques de référence ont été fixées. Les experts estiment qu'il est également nécessaire de renforcer les recherches méthodologiques sur les « effets cocktails » des formulations.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses endosse les conclusions et recommandations du groupe d'expertise collective d'urgence.

L'Agence rappelle ses travaux récents sur la question des enjeux relatifs à l'évaluation des risques concernant les OGM et ses apports méthodologiques sur la question. Elle a dans ce contexte, et dans un cadre novateur au plan européen, produit en 2011 un avis visant à renforcer les conditions de mise en œuvre des études de toxicité sub-chronique de 90 jours en proposant une méthodologie d'analyse des données offrant un haut niveau d'exigence. Un projet de règlement européen est en cours de finalisation et a été soumis aux Etats membres au printemps 2012 ; il impose la conduite de tests à 90 jours dans les conditions préconisées par L'Agence.

S'agissant des produits phytopharmaceutiques, l'Agence s'est investie au niveau européen pour porter des développements méthodologiques permettant de mieux appréhender les effets cumulés entre substances actives. Ces méthodologies sont en cours d'introduction dans les référentiels d'évaluation européens. Elles ont vocation à être étendues à la question des effets cumulés entre substances actives et coformulants.

Par ailleurs, l'Anses est largement investie dans des questions potentiellement sous-tendues par l'étude de *Séralini et al.*. Il convient de souligner ici le travail d'envergure porté par l'Agence depuis plusieurs années sur les perturbateurs endocriniens et de façon plus générale sur la question des faibles doses. Il est important de souligner aussi les travaux de recherche portés par l'Agence sur la question de l'identification des mélanges de xénobiotiques et de l'identification de leurs effets synergiques éventuels (« effets cocktails »), étudiés dans le cadre du programme Périclés.

De façon plus générale, le vif débat public suscité par la publication d'un travail de recherche interrogeant les potentiels effets long terme d'un OGM associé à une formulation phytosanitaire courante montre la nécessité de consolider encore les connaissances scientifiques dans ce domaine.

³⁹ Notamment les programmes en cours (Projet GRACE FP7-KBBE Project reference: 311957)...

Ce débat s'inscrit dans un paysage scientifique constitué de publications d'origines diverses. On recense d'un côté des études réglementaires financées par les industriels et de l'autre des travaux de recherche publique, aux moyens plus limités, cherchant à investiguer des effets sanitaires potentiels peu documentés à ce jour. Cette situation n'est pas spécifique aux OGM mais ce domaine est l'un de ceux où elle est fortement marquée et où l'attente sociétale en matière de recherche indépendante est particulièrement aiguë.

Dans ce cadre, sur un plan plus général, l'Anses appelle à la mobilisation de financements publics nationaux ou européens dédiés à la réalisation d'études et de recherches d'envergure visant à consolider les connaissances scientifiques sur des risques sanitaires insuffisamment documentés.

S'agissant des besoins d'études et de recherches pointés par le groupe d'expertise d'urgence, l'Agence recommande :

- D'engager des recherches visant à décrire les effets potentiels sur la santé associés à la consommation sur le long terme d'OGM ou à l'exposition aux formulations phytopharmaceutiques. Ces recherches devront se focaliser notamment sur la question de l'exposition aux OGM et aux résidus de produits phytopharmaceutiques associés. Ces études devraient être menées dans le cadre de financements publics et sur la base de protocoles d'investigation précis permettant de répondre aux questions posées (effets recherchés, paramètres suivis, méthodologie d'investigation, nombre et nature des animaux suivis, complexité de l'OGM, nature des expositions, ...). L'Anses est prête en association avec d'autres partenaires et notamment d'autres agences sanitaires européennes à travailler à l'établissement des principes généraux de tels protocoles d'étude ;
- De façon plus large, l'Anses souligne la nécessité de renforcer l'effort de recherche relatif aux enjeux sanitaires associés à l'exposition chronique aux xénobiotiques (substances actives, coformulants), à leurs mélanges et à leurs synergies éventuelles, notamment en matière d'effets avec les OGM.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

OGM, produits phytopharmaceutiques, NK603, ROUNDUP, étude à long terme

BIBLIOGRAPHIE

AFSSA (2002) Evaluation des risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés (Risk assessment for the consumption of foods composed of or derived from GMOs). AFSSA, Maisons-Alfort. 40 p.

AFSSA, AFSSAPS (2005) Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation – recommandations. AFSSA, Maisons-Alfort. 440 p.

ANSES (2011) Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM (saisine 2009-SA-0285). ANSES, Maisons-Alfort. 95 p.

Baskaran N, et al. (2010) Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *European Journal of Pharmacology* 637(1-3), 22-29.

Benjamini Y, Hochberg D (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1), 289-300.

De La Parra C, et al. (2007) Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10), 4177-4183.

Domingo JL (2007) Toxicity studies of genetically modified plants: a review of the published literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(8), 721-33.

Domingo JL, Giné Bordonaba J (2011) A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. *Environment International* 37(4), 734-742.

EFSA (2006) Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal* 99, 1-100.

EFSA (2009a) Scientific opinion on statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal* 1250, 1-62. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1250.pdf>

EFSA (2009b) Scientific report of EFSA prepared by the GMO Unit on public consultation on the updated guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms (GMO) for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. No. EFSA Scientific Report n°293.

EFSA (2010) Scientific opinion on the assessment on the allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *EFSA Journal* 8(7), 1700[168 p.].

EFSA (2011a) Scientific Opinion on Guidance document on Selection of Comparators for the Risk Assessment of GM Plants. *EFSA Journal* 9(5), 2149.

EFSA (2011b) Scientific Opinion on Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal 9(5), 2150 [37 p.].

Hammond B, et al. (2004) Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. Food and Chemical Toxicology 42(6), 1003-1014.

Kuhnle GGC, et al. (2009) Phytoestrogen content of cereals and cereal-based foods consumed in the UK. Nutrition and Cancer 61(3), 302-309.

Malatesta M, et al. (2008) A long-term study on female mice fed on a genetically modified soybean: Effects on liver ageing. Histochemistry and Cell Biology 130(5), 967-977.

OCDE (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties on maize (Zea Mays): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. OCDE, Paris.

OECD (1998) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents OECD.

Ridley WP, et al. (2002) Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That of Conventional Corn (Zea mays L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(25), 7235-7243.

Romano MA, et al. (2012) Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. Archives of Toxicology 86(4), 663-673.

Romano RM, et al. (2010) Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Archives of Toxicology 84(4), 309-317.

Sakamoto Y, et al. (2008) A 104-week feeding study of genetically modified soybeans in F344 rats. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 49, 272 - 282.

Sakamoto Y, et al. (2007) A 52-week feeding study of genetically modified soybeans in F344 Rats. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 48(3), 41-50.

Séralini GE, et al. (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. Food and Chemical Toxicology. *Sous presse*

Snell C, et al. (2012) Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. Food and Chemical Toxicology 50(3-4), 1134-1148.

Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. (2000) Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ Health Perspect. 108(8), 769-776.

ANNEXES

Annexe 1

Composition du groupe d'expertise collective d'urgence (GECU NK603-R)

Président

M. Jean-Pierre CRAVEDI - Directeur de recherche, INRA, Toulouse

Membres

M. Michel GAUTIER – Professeur des universités, AGROCAMPUS OUEST, Rennes

Mme Mariette GERBER – Docteur en médecine – Chercheur, INSERM, Retraitée

M. Joël GUILLEMAIN – Toxicologue, Chargé de cours, Université de Tours

M. Florian GUILLOU - Directeur de recherche, INRA, Nouzilly

M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche, INRA, Thiverval-Grignon

M. Fabrice NESSLANY – Chef de service du laboratoire de toxicologie-génétique, Institut Pasteur, Lille

M. Erwan POUPON – Professeur des universités, Faculté de pharmacie, Université de Paris Sud

Mme Marie-Anne ROBIN - Directeur de recherche, INSERM, Rennes

Mme Paule VASSEUR – Professeur-Emérite, Université de Lorraine (Metz)

Annexe 2

Les normes OCDE pour les études à long terme et Bonnes Pratiques de laboratoire

Il convient de distinguer les effets chroniques non cancérogènes des effets cancérogènes. Trois lignes directrices OCDE correspondent à ces effets :

- OCDE 451 – Etude de cancérogénèse

L'objectif d'une étude à long terme de cancérogénèse est d'observer des animaux d'essai au cours de la majeure partie de leur durée de vie, pour suivre le développement éventuel de lésions néoplasiques durant ou après l'exposition à diverses doses d'une substance d'essai par une voie d'administration appropriée. Cette ligne directrice concerne principalement des essais sur rats et souris, et une administration orale. Des animaux des deux sexes sont employés. Chaque groupe traité et groupe témoin contient au moins 50 animaux de chaque sexe. Trois niveaux de dose et un témoin sont employés au moins. La substance d'essai est administrée chaque jour par voie orale (cutanée ou par inhalation), et le mode d'exposition est ajusté selon le profil toxicocinétique de la substance d'essai. La durée de l'étude est normalement de 24 mois pour les rongeurs. Pour des souches de souris spécifiques, une durée de 18 mois peut être plus appropriée. La clôture de l'essai est envisagée lorsque le nombre de survivants dans les groupes de dose la plus faible ou dans le groupe témoin tombe en dessous de 25 %. Les résultats de ces études incluent des mesures (pesée, consommation de nourriture) et au moins des observations quotidiennes détaillées, ainsi que l'autopsie générale et l'histopathologie.

- OCDE 452 – Etude de toxicité chronique

L'objectif des études de toxicité chronique est de caractériser le profil d'une substance dans des espèces mammifères (essentiellement rongeurs) à la suite d'une exposition prolongée et répétée. La ligne directrice porte particulièrement sur les rongeurs et l'administration orale. Des animaux des deux sexes doivent être employés. Pour des rongeurs, chaque groupe de traitement contient au moins 20 animaux de chaque sexe, tandis que pour des non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Au moins trois niveaux de dose doivent être employés en plus du groupe témoin. La fréquence de l'exposition est usuellement quotidienne, mais elle peut varier selon la voie choisie (orale, cutanée ou inhalation) et elle est ajustée selon le profil toxicocinétique de la substance d'essai. La durée de la période d'exposition est d'au moins 12 mois. Les résultats de ces études incluent des mesures (pesée), des observations détaillées régulières (examen hématologique, analyse d'urine, chimie clinique), ainsi que des procédures d'autopsie et l'histopathologie.

- OCDE 453 – Etudes combinées de toxicité chronique et de cancérogénèse

L'objectif d'une étude combinée de toxicité chronique/cancérogénèse est l'identification des effets cancérogènes et chroniques dans des espèces mammifères, et la détermination des relations dose-effets à la suite d'une exposition prolongée et répétée. Le rat est typiquement utilisé dans cette étude. Pour les rongeurs, chaque groupe de dose et groupe témoin de la phase « cancérogénèse » contient au moins 50 animaux de chaque sexe, tandis que pour la phase « toxicité chronique », chaque groupe contient 10 animaux de chaque sexe. Au moins trois niveaux de dose et un témoin sont utilisés pour chacune des phases « cancérogénèse » et « Toxicité chronique ». Les trois voies d'administration principales sont les voies orale, cutanée, et l'inhalation. La Ligne directrice traite plus particulièrement de la voie orale. La durée de l'étude est normalement de 12 mois pour la phase « toxicité chronique » et de 24 mois pour la phase « cancérogénèse ». Le rapport d'étude inclut des mesures (pesée) et observations détaillées régulières (examen hématologique, analyse d'urine, chimie clinique), tout comme des procédures d'autopsie et l'histopathologie. Toutes ces observations permettent la détection des effets néoplasiques et la détermination du potentiel cancérogène, ainsi que la détermination de la toxicité générale.

Pour les substances actives phytopharmaceutiques, la ligne directrice utilisée est la ligne OCDE 453 afin d'évaluer dans une seule étude les effets chroniques et cancérogènes. Une étude chez le rat et une étude chez la souris sont exigées.

- Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)

Initialement élaborées par la Food and Drug Administration (FDA, USA) en 1976, puis reprise par l'OCDE en 1978, les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) constituent un mode d'organisation couvrant l'ensemble des aspects organisationnels et opérationnels liés à la réalisation des essais de sécurité non cliniques sur les produits chimiques. Leurs objectifs sont de garantir la qualité, la reproductibilité et l'intégrité des données générées à des fins réglementaires, afin que celles-ci puissent être reconnues au niveau international sans qu'il soit nécessaire de reproduire les études.

Pour la Communauté européenne, les principes de BPL sont définis par la directive 2004/10/CE. La conformité des études aux principes des BPL est assurée par la mise en place de programmes nationaux de vérification des études et d'inspection des laboratoires d'essai. En Europe, l'inspection et la vérification des bonnes pratiques de laboratoire fait l'objet de la directive 2004/9/CE.

Le cas particulier des études mettant en jeux des sites multiples a fait l'objet de dispositions particulières (OCDE ENV/JM/MONO(2002)9).

Annexe 3

Historique d'évaluation du ROUNDUP™ GT plus

La préparation utilisée dans l'étude de Séralini *et al.* (2012) pour l'administration *via* l'eau de boisson est le ROUNDUP GT PLUS. La substance active de cette préparation est le glyphosate (sous forme de sel d'isopropylamine).

Le glyphosate est une substance active approuvée au niveau européen en 2001. Des valeurs de référence ont alors été fixées. Le glyphosate est actuellement en cours de ré-examen au niveau européen. L'état membre rapporteur, l'Allemagne, est chargé de la ré-évaluation de l'ensemble des données toxicologiques réglementaires et des données issues de la littérature. Cette évaluation ayant débuté en mai 2012, elle sera mise à la disposition de l'EFSA⁴⁰ et des autres états membres en juin 2013.

Dans le rapport d'évaluation du glyphosate et son addendum, les études suivantes, soumises par les nombreux notifiants concernés par cette substance active, ont été examinées par les autorités allemandes. Ce rapport d'évaluation a également été revu par les experts des autres états membres.

Substance active glyphosate :

- cinétique (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) : 12 études dont 3 de la littérature réalisées avec du glyphosate ou du ROUNDUP.
- toxicité aiguë par voie orale chez le rat, la souris : plus de 20 études.
- toxicité aiguë par voie cutanée chez le rat et le lapin : 15 études.
- toxicité aiguë par inhalation chez le rat : 9 études.
- irritation cutanée chez le lapin : 12 études.
- irritation oculaire chez le lapin : 11 études.
- sensibilisation cutanée chez le cobaye : 9 études.
- toxicité subaiguë par voie orale : chez le rat (3 études sur 28 jours), la souris (1 étude sur 30 jours) et le chien (2 études « range-finding »).
- toxicité subchronique par voie orale : 9 études chez le rat (sur 90 jours) dont une de la littérature effectuée par le NTP⁴¹, 3 études chez la souris (sur 90 jours) dont une de la littérature effectuée par le NTP, 6 études chez le chien (sur 3 mois à 1 an).
- toxicité subaiguë par voie cutanée : 3 études chez le lapin (sur 21 ou 28 jours), une étude chez le rat (sur 21 jours).
- toxicité subaiguë par inhalation : une étude sur 14 jours chez le rat et une étude de la littérature sur 28 jours chez le rat avec du ROUNDUP.
- études de génotoxicité *in vitro* : 9 tests d'AMES, 2 tests d'aberrations chromosomiques, 1 test de mutation génique sur cellules de mammifères, 6 tests de réparation de l'ADN.
- études de génotoxicité *in vivo* : 6 tests de micronoyau ou d'aberration chromosomique chez le rat ou la souris, 3 tests sur cellules germinales (« Dominant léthal »).

⁴⁰ EFSA : Autorité européenne de la sécurité des aliments.

⁴¹ NTP : National

Toxicology Program. <http://ntpsearch.niehs.nih.gov/query.html?qt=glyphosate&col=015abst&col=020rpt&charset=iso-8859-1>

Les études réalisées sur le glyphosate montrent que celui-ci ne possède pas de propriétés génotoxiques *in vivo*.

- Etudes chroniques et de cancérogénèse : 4 études chez le rat et 4 études chez la souris qui sont résumées ci-dessous :

Espèce/Durée	Doses	NOEL ⁴² /NOAEL ⁴³	Organe cible	Référence
Rat Wistar, 2 ans 50 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 100 – 1000 – 10000 ppm	NOAEL : 1000 ppm (60 mg/kg/j) NOEL : 100 ppm (6.3 mg/kg/j)	Effets hépatiques (indication biochimiques). Cataractes (faible évidence) Ces effets sont observés à 10000 ppm (LOAEL). A 1000 ppm (LOEL) des effets sur la phosphatase alcaline sont observés mais non constants au cours de l'étude.	Suresh, 1996
Rat Sprague Dawley, 2 ans 85 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 10 – 100 – 300 – 1000 mg/kg/j	NOEL : 10 mg/kg/j	Glandes salivaires (effets histologiques). Faible toxicité hépatique Ces effets sont observés à partir de 100 mg/kg/j.	Atkinson <i>et al.</i> , 1993
Rat Sprague Dawley, 2 ans 60 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 2000 – 8000 – 20000 ppm	NOEL : 2000 ppm (89 mg/kg/j)	Cataractes, faible effet hépatique à 20000 ppm. Inflammation gastrique à 8000 ppm (LOEL).	Stout and Ruecker, 1990
Rat Sprague Dawley, 26 mois 50 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 3 – 10 – 31 mg/kg/j chez le mâle. 0 – 3.4 – 11 – 34 mg/kg/j chez la femelle	NOEL : 31 mg/kg/j	Pas d'effet lié au traitement	Lankas, 1981
Souris CD-1, 2 ans 50 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 100 – 300 – 1000 mg/kg/j	NOAEL : 1000 mg/kg/j	Pas d'effet lié au traitement	Atkinson <i>et al.</i> , 1993
Souris Balb/c, 18 mois 25 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 75 – 150 – 300 ppm	NOAEL : 150 ppm (15 mg/kg/j)	Baisse du gain de poids et de la consommation alimentaire à 300 ppm.	Bhide, 1988 *
Souris CD-1, 2 ans 50 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 1000 – 5000 – 30000 ppm	NOEL : 1000 ppm (157 mg/kg/j)	Effets sur le foie (30000 ppm) et vessie (5000 ppm) chez les mâles uniquement..	Knezevich and Hogan, 1983
Souris CFLP/LATI, 18 mois 50 animaux de chaque sexe par lot.	0 – 100 – 300 ppm	NOAEL : 300 ppm (30 mg/kg/j)	Pas d'effet lié au traitement	Vereczkey and Csanyi, 1982 (rev. 1992)

*Etude non acceptable pour évaluer les effets cancérogènes

Ces études ne montrent aucune augmentation significative de l'incidence des tumeurs chez les animaux traités avec le glyphosate.

⁴² NOEL : No observed effect level (dose sans effet).

⁴³ NOAEL : No observed adverse effect level (dose sans effet néfaste observé).

- Etudes sur les fonctions de reproduction : Deux études sur une génération chez le rat, 3 études sur 2 générations chez le rat, trois études sur 3 générations chez le rat, une étude de la littérature sur des effets spécifiques de fertilité.
- Etude de toxicité sur le développement : 5 études chez le rat, 5 études chez le lapin et une étude chez la souris.

Les résultats de ces études montrent que le glyphosate n'entraîne pas d'altération des fonctions de reproduction.

Des études ont également été réalisées sur l'AMPA⁴⁴ qui est le principal métabolite du glyphosate :

- Toxicité aiguë par 3 voies d'exposition, irritation cutanée et irritation oculaire, sensibilisation cutanée, études subaiguës et subchroniques (4 études chez le rat pendant 14 à 90 jours, 2 études chez le chien pendant 1 mois et 90 jours). Il existe également 3 études de toxicité sur le développement.

Sur la base de ces études, les valeurs de référence suivantes (exprimées en dose de substance active) ont été dérivées

- DJA : 0,3 mg/kg/jour
- ARfD : non pertinente
- AOEL : 0,2 mg/kg/jour

En se fondant également sur ces éléments, les classifications du glyphosate et des sels de glyphosate ont été déterminées par un groupe d'expert européen pour la classification et l'étiquetage.

Les classifications harmonisées au niveau européen selon le règlement (CE) n° 1272/2008 sont les suivantes:

Pour le glyphosate acide :

H318 Eye Irritant Cat. 1 (R41 dans la classification selon l'ancien système)

H411 Aquatic Chronic. 2 (R51/53 dans la classification selon l'ancien système)

Pour les sels de glyphosate :

H411 Aquatic Chronic. 2 (R51/53 dans la classification selon l'ancien système)

Préparations à base de glyphosate

14 préparations différentes ont été étudiées dans le rapport d'évaluation européen. Pour la majorité de ces préparations, les données requises ont été fournies : toxicité aiguë par 3 voies d'administration, irritation cutanée et irritation oculaire, sensibilisation cutanée, pénétration cutanée (*in vitro* sur peau humaine et de singe, *in vivo* chez le singe).

Des études de génotoxicité *in vitro* ont également été réalisées avec des formulations contenant la glyphosate et un surfactant (Williams 2000⁴⁵) : 6 test d'Ames, 2 tests sur drosophiles, 1 test d'aberrations chromosomiques, 2 tests d'échanges de chromatides sœurs.

Quelques études de génotoxicité *in vivo* sont également disponibles : 6 tests de micronoyau. Trois tests sur les effets sur l'ADN sont également présentés.

Les résultats montrent que le poids de la preuve ne met pas en évidence de propriétés génotoxiques des préparations ROUNDUP.

Co-formulants utilisés dans les préparations ROUNDUP

Un document synthétique de l'US EPA (2009)⁴⁶, reprend les principales études toxicologiques disponibles sur ces co-formulants. Ces co-formulants ont également fait l'objet d'une évaluation de l'Anses en tant qu'adjuvants pour bouillies herbicides.

⁴⁴ AMPA : acide aminométhylphosphonique.

⁴⁵ Williams GM, *et al.* (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(2 I), 117-165

⁴⁶ US-EPA proposed the following VTRs (source: <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2009/June/Day-17/p14113.pdf>)

Les dossiers toxicologiques de ces substances comportent des études de toxicité aiguë, des études d'irritation, de sensibilisation, des études de génotoxicité *in vitro* (test d'Ames, mutagénicité et aberrations chromosomiques), des études de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat (2 études) et chez le chien (1 étude), 2 études de screening pour les propriétés de toxicité pour la reproduction chez le rat.

Une lecture croisée avec les données disponibles d'autres adjuvants considérés comme équivalents a permis de déterminer les valeurs toxicologiques de référence pour ces adjuvants :

- DJA : 0,15 mg/kg/jour
- ARfD : 0,72 mg/kg
- AOEL : 0,15 mg/kg/jour

Préparation phytopharmaceutique ROUNDUP GT PLUS

La préparation ROUNDUP GT PLUS est constituée de glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine, d'un co-formulant et d'eau. Elle a fait l'objet d'une évaluation de l'Afssa en 2006 pour des usages en jardin d'amateur, l'usage revendiqué et évalué étant le désherbage avant mise en culture.

Les résultats concernant les risques pour la santé humaine, présentés dans l'avis de l'Afssa du 16 avril 2007, sont les suivants :

Considérant les propriétés toxicologiques

La dose journalière admissible (DJA) du glyphosate acide, fixée dans le cadre de son inscription à l'annexe I, est de 0,3 mg/kg/jour. Elle a été déterminée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet obtenue dans une étude de 2 ans par voie orale chez le rat.

Les études réalisées avec une préparation comparable, contenant le même co-formulant et 490 g/L de glyphosate au lieu de 450 g/L dans la préparation ROUNDUP GT PLUS donnent les résultats suivants :

- une DL₅₀⁴⁷ par voie orale et par voie cutanée chez le rat supérieure à 5000 mg/kg,
- un effet faiblement irritant oculaire chez le lapin,
- pas d'effet irritant cutané chez le lapin,
- pas d'effet de sensibilisation cutanée chez le cobaye.

Au vu de des résultats des études et des données disponibles sur les co-formulants, cette préparation ne nécessite pas de classement relatif à sa toxicité aiguë et à son potentiel irritant et sensibilisant.

Considérant les données relatives à l'exposition de l'opérateur, des personnes présentes et des travailleurs

Le niveau acceptable d'exposition pour l'opérateur (AOEL) pour le glyphosate acide, fixé dans le cadre de son inscription à l'annexe I, est de 0,2 mg/kg /jour. Il a été déterminé en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet obtenue dans une étude de tératogenèse par voie orale chez le lapin. L'absorption cutanée retenue pour l'évaluation de l'exposition de l'opérateur est de 3 % (déterminée à partir notamment d'une étude *in vitro* sur peau humaine et d'une étude *in vivo* chez le singe Rhésus).

En considérant les conditions d'application suivantes de la préparation ROUNDUP GT PLUS pour le jardin d'amateur, sans port de gant, l'exposition systémique des applicateurs a été estimée sur la base des études spécifiques disponibles selon les paramètres suivants :

- dose d'emploi : 5,6 mL/10m², avec 460 g/L de glyphosate et 89,8 g/L de co-formulant ;
- méthode d'application : pulvérisation ; appareillage utilisé : pulvérisateur à pression préalable.

⁴⁷ DL₅₀ : la dose létale 50 est une valeur statistique de la dose d'une substance/préparation dont l'administration unique par voie orale provoque la mort de 50% des animaux traités.

L'exposition estimée, exprimée en pourcentage de l'AOEL, est la suivante :

% AOEL glyphosate	% AOEL Co-formulant
35	31

Au regard de ces résultats, il est estimé que le risque sanitaire des applicateurs en jardins d'amateur est considéré comme acceptable⁴⁸ sans port de gants pendant les opérations de préparation et d'application de la préparation.

Une évaluation de risque complémentaire afin de prendre en compte les effets cumulés potentiels à terme, relatifs à la présence de plusieurs substances dans un mélange peut être réalisée.

Différentes approches d'évaluation des risques cumulés sont disponibles dans la littérature, l'approche développée ci-dessous se fondant notamment sur celle préconisée par le Chemical Regulation Directorate (CRD UK) et sur celle présentée dans le rapport de l'Anses de juin 2010⁴⁹.

La méthodologie⁵⁰ utilisée repose sur le calcul de quotients de risque (QR) définis pour chaque substance active comme le rapport du niveau d'exposition estimé / valeur de référence (AOEL). Puis, la somme des quotients de risque (Σ QR) de chaque substance est effectuée pour donner un indice de risque (IR).

Si l'IR est < 1, les risques pour l'opérateur, les personnes présentes et le travailleur sont considérés comme acceptables.

Si l'IR est > 1, les risques pour l'opérateur, les personnes présentes et le travailleur sont considérés comme inacceptables.

Les pourcentages d'AOEL, les quotients de risque (QR) pour chaque substance active, ainsi que les indices de risque, sont les suivants :

% d'AOEL [Quotients de risque (QR)]		Somme des quotients de risque (Σ QR) ou indice de risque (IR)
Glyphosate (0,2 mg/kg/j)	Co-formulant (0,15 mg/kg/j)	
35 %	31 %	0,66
(0,35)	(0,31)	

L'exposition de l'expérimentateur amateur (sans port de gants) est inférieure à 100 % de l'AOEL pour le glyphosate et le co-formulant.

L'indice de risque estimant le risque cumulé des substances actives dans la préparation est inférieur à 1 (0,66). Le risque lié à l'exposition simultanée du glyphosate et du co-formulant peut donc être considéré comme acceptable.

Considérant les données relatives aux résidus et à l'exposition du consommateur

L'usage revendiqué ne conduit à aucune exposition directe des cultures lors de la pulvérisation de la préparation. Cependant, compte tenu des propriétés systémiques du glyphosate (migration dans la plante) une évaluation des risques est nécessaire, elle prend en compte le niveau d'absorption de la substance par les cultures suivantes installées sur la zone préalablement traitée.

⁴⁸ Règlement (UE) n° 546/2011 de la Commission du 10 juin 2011 portant application du règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les principes uniformes d'évaluation et d'autorisation des produits phytopharmaceutiques

⁴⁹ Proposition d'une démarche d'évaluation des risques sanitaires agrégés et cumulés liés à une exposition à un mélange de phtalate de butylbenzyle et de phtalate de dibutyle » CES Evaluation des risques liés aux substances chimiques, Juin 2010, version finale N°1, www.afsset.fr.

⁵⁰ Une note d'information est disponible sur le site de l'Anses.

Rappel de données concernant la substance active

Des études de métabolisme dans les principales catégories de plantes (23 types de culture) et chez l'animal (chèvre et poule pondeuse), et des études de procédés de transformation des produits végétaux et de résidus dans les cultures suivantes ont été réalisées. Ces études ont permis de retenir le glyphosate pour la définition du résidu dans les produits d'origine végétale et animale. Ces résultats ont été utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques.

Evaluation du risque pour le consommateur pour le glyphosate

En se fondant sur la DJA de 0,3 mg/kg p.c./j, l'évaluation de l'exposition du consommateur⁵¹ montre que pour l'adulte, le bambin (13-18 mois) et le nourrisson (7-12 mois), l'apport journalier maximum théorique (AJMT) estimé à partir de l'ensemble des LMR fixées pour les produits végétaux et animaux représente moins de 18 % de la DJA. Le risque chronique pour l'ensemble des consommateurs est considéré comme acceptable.

Pour les différents usages, des délais avant récolte ont été fixés de façon à ce que les niveaux de résidus dans les denrées soient inférieurs aux LMR.

Evaluation du risque pour le consommateur pour le co-formulant

L'usage revendiqué ne conduit à aucune exposition directe des cultures lors de la pulvérisation de la préparation. Compte tenu des données rapportées dans la littérature, il peut être estimé que le co-formulant n'est pas doté de propriétés de systémie et qu'il reste sur la plante à l'endroit du traitement. Ses métabolites, notamment l'acide gras en C14 (acide myristique), peuvent être mobiles dans la plante mais ont été considérés comme présentant une faible toxicité et, dans le cadre de l'évaluation européenne des acides gras (C7-C20), il n'a pas été jugé nécessaire de fixer pour eux de valeurs toxicologiques de référence. Par ailleurs, des articles disponibles dans la littérature scientifique sur la dégradation de ce type de co-formulant dans l'environnement^{52, 53, 54} montrent que ces substances sont rapidement dégradées par les microorganismes. De plus les Koc⁵⁵ élevés (2500 à 9600) indiquent que lorsque le co-formulant entre en contact avec le sol, il est fortement lié à ce dernier. En prenant en compte ces données, il est estimé que l'absorption du co-formulant de la préparation ROUNDUP GT PLUS par les racines des plantes implantées après le traitement peut être considérée comme négligeable. Le transfert et la présence de ce co-formulant dans les eaux souterraines sont donc peu probables.

En conclusion, pour l'usage revendiqué, l'exposition des consommateurs au co-formulant est considérée comme négligeable. Ainsi, une évaluation de risque cumulé du glyphosate et du co-formulant, qui pourrait être conduite selon une méthodologie comme indiquée ci-dessus ou selon celle en développement au niveau européen (Programme européen ACROPOLIS), n'apparaît pas pertinente.

Le risque pour les consommateurs pour l'usage revendiqué peut être considéré comme acceptable.

Glyphosate (ou ROUNDUP) sur NK603

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a rendu un avis le 9 mars 2010, relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation ROUNDUP READY à base de glyphosate de la société MONSANTO AGRICULTURE France S.A.S pour un usage sur le désherbage du maïs (uniquement sur maïs tolérant au glyphosate portant l'événement de transformation NK 603 et exprimant la protéine CP4 EPSPS).

⁵¹ PRIMo revision 2 (EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Reasoned opinion on the potential chronic and acute risk to consumers' health arising from proposed temporary EU MRLs according to Regulation (EC) No 396/2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in Food and Feed of Plant and Animal Origin. 15 March 2007.

⁵² Behaviour of three nonionic surfactants following foliar application - Peter J. Holloway, Dawn Silcox - Department of Agricultural Sciences, University of Bristol, Long Ashton Research Station, Long Ashton, Bristol, BS18 9AF, UK.- British Crop Protection Conferences – weeds(1985).

⁵³ Behavior of Polyoxyethylene sorbitan ¹⁴C-monooleate in Tobacco and kidney bean leaves.-Yukio Sugimura and Tsuneyuki Takeno -J. Pesticide Sci 10, 323-239(1985).

⁵⁴ Behavior and fate of ethoxylated alkyl phenol nonionic surfactant in barley plants - Gary E Stolzenberg, Prudence A Olson, Richard G Zaylstie, Eugene Mansager - J agri Food Chem (1982) 637-644.

⁵⁵ Koc : coefficient de partage sol-solution par unité de masse de carbone organique.

Des essais résidus réalisés avec la préparation ROUNDUP READY sur des cultures de maïs tolérant au glyphosate ont été soumis et examinés dans le cadre de ce dossier.

Les risques évalués pour les opérateurs, les consommateurs et l'environnement ont été jugés acceptables. L'avis⁵⁶ est disponible sur le site de l'Anses.

⁵⁶ Avis de l'Afssa n°2007-3111 du 9 mars 2010 relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de la préparation ROUNDUP READY à base de glyphosate, de la société MONSANTO AGRICULTURE France S.A.S.

Annexe 4

Historique d'évaluation du maïs NK 603

Les maïs porteurs de l'évènement NK603 présentent une tolérance au glyphosate. Les gènes introduits dans ce maïs proviennent d'une bactérie commune du sol *Agrobacterium sp.* souche CP4. La construction génétique utilisée comporte deux gènes insérés en tandem dans un seul site d'insertion, permettant l'expression de deux enzymes 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: la CP4 EPSPS et la CP4 EPSPS L214P. Un gène est sous le contrôle du promoteur de l'actine de riz, l'autre du promoteur 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Les deux protéines diffèrent seulement par la substitution d'un acide aminé en position 214 remplaçant une leucine par une proline (CP4 EPSPS L214P).

Les protéines EPSPS sont des enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'acide shikimique (annexe 7) : voie de biosynthèse d'acides aminés aromatiques (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) dans les végétaux, les champignons et les micro-organismes. Ces protéines sont ubiquitaires dans ces organismes et absentes chez les animaux qui ne produisent pas leurs propres acides aminés aromatiques et doivent les trouver dans leur alimentation.

Le glyphosate est un herbicide agissant au niveau de l'étape catalysée par la protéine EPSPS en bloquant la synthèse des trois acides aminés aromatiques. Chez les plantes sensibles, ce blocage conduit à l'arrêt des synthèses des protéines, de l'auxine et de la lignine ainsi qu'à une dérégulation de la voie du chorismate, et de lien en lien à la mort des plantes.

La présence de deux transgènes issus d'*Agrobacterium sp.* CP4 dans les maïs génétiquement modifiés NK603 conduit à une synthèse de la protéine EPSPS bactérienne moins sensible au glyphosate permettant au maïs de conserver une synthèse des acides aminés aromatiques (Padgett *et al.*, 1993). Les maïs porteurs de l'évènement NK603 possèdent ainsi une tolérance au glyphosate à des doses permettant un désherbage vis-à-vis des adventices sensibles.

Les maïs NK603 ont fait l'objet de deux avis de l'Afssa pour l'alimentation animale (Afssa, 2003 et 2004) et de deux avis également pour l'alimentation humaine (Afssa, 2003 et 2004), l'Afssa ayant demandé au pétitionnaire des pièces complémentaires n'a statué qu'en janvier 2004. L'EFSA a rendu un avis favorable le 25 novembre 2003 (EFSA, 2003). Les autorisations des maïs NK603 ont été données selon deux réglementations européennes : la directive 2001/18 pour l'alimentation animale et le Règlement 258/97/CE pour l'alimentation humaine.

La Commission européenne a publié deux décisions autorisant la mise sur le marché d'aliments et ingrédients alimentaires issus de la lignée de maïs génétiquement modifié NK603 en tant que nouveaux aliments ou nouveaux ingrédients⁵⁷ ou pour l'alimentation animale⁵⁸.

En 2006, un nouveau dossier d'autorisation de mise sur le marché pour la culture, l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de produits dérivés a été déposé dans le cadre du Règlement (CE) N° 1829/2003. Ce dossier ne comportait aucun élément supplémentaire par rapport aux dossiers déjà évalués par l'Afssa pour l'évaluation du risque sanitaire lié à la consommation humaine ou animale de ce maïs, en dehors d'études pour l'évaluation des risques environnementaux liés à la culture. Ces éléments en dehors du champ de compétences de l'Afssa ont fait l'objet d'une évaluation par la Commission du Génie Biomoléculaire. L'EFSA a rendu un avis le 27 mai 2009 se prononçant simultanément dans le cadre du Règlement (CE) N° 1829/2003 et sur le renouvellement de l'autorisation des maïs NK603 pour les produits autorisés dans la réglementation antérieure (EFSA, 2009). L'avis de l'Afssa n'a pas été sollicité sur le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché de ces maïs.

⁵⁷ Décision de la Commission européenne du 3 mars 2005 (2005/448/CE) autorisant la mise sur le marché d'aliments et ingrédients alimentaires issus de la lignée de maïs GM NK 603 en tant que nouveaux aliments ou nouveaux ingrédients alimentaires, en application du règlement 258/97/CE (JOCE 21/06/05).

⁵⁸ Décision de la Commission européenne du 19 juillet 2004 (2004/643/CE) concernant la mise sur le marché, conformément à la directive 2001/18/CE, d'un maïs génétiquement modifié (*Zea mays* L. lignée NK603) pour améliorer sa tolérance au glyphosate (JOCE 18.09.04).

Les dossiers évalués par l'Afssa sur les maïs NK603 (saisines 2003-SA-0027, 2003-SA-0047, 2003-SA-0401 et 2003-SA-0242) comportaient des informations relatives à :

- la modification génétique et au maïs génétiquement modifié NK 603,
- la composition chimique du maïs grain et de la plante entière et à sa qualité nutritionnelle,
- aux teneurs en protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P dans les tissus de maïs,
- l'évaluation du potentiel toxique des protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P dans des études de toxicité aiguë⁵⁹, de dégradation *in vitro*, de recherche d'homologie de séquence avec des protéines toxiques et allergènes,
- une étude de valeur alimentaire chez les poulets en croissance,
- une étude de toxicité sub-chronique réalisée avec l'aliment par administration orale répétée pendant 90 jours chez le rat (cf paragraphe ci dessous) et des calculs de marge d'exposition au maïs.

Le potentiel allergique du maïs NK603 a été évalué à la lumière d'un ensemble d'éléments comme le recommande les lignes directrices :

- l'absence de potentiel allergique connu de l'organisme source (*Agrobactérium*),
- l'absence d'identité de séquences protéiques (dont 8 acides aminés consécutifs) entre la structure primaire des protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P et celles des protéines connues comme étant des allergènes ou des toxines,
- l'hydrolyse rapide *in vitro* des protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P.

Au regard de ces éléments, l'existence d'un potentiel allergique de ces deux protéines et du maïs NK603 n'a pas été suspectée.

Etude de toxicité sub-chronique

Une étude de toxicité subchronique a été réalisée pendant 90 jours en 2001 sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet d'une alimentation contenant deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain NK 603 en comparaison avec une alimentation contenant un maïs ayant le même fonds génétique et 6 autres variétés de maïs. Les maïs ont subi un traitement au glyphosate. Cette étude n'a pas mis en évidence de différences jugées par les experts comme significatives pour l'ensemble des paramètres biologiques observés entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique (Afssa, 2003).

En décembre 2009, l'Afssa s'est auto-saisie pour analyser les résultats d'une publication de Spiroux de Vendômois *et al.* (Spiroux de Vendômois *et al.*, 2009) visant à réexaminer les données de cette étude de toxicité sub-chronique. Cette publication mettait en évidence des différences significatives dans certains groupes et traitements sur les fonctions hépatiques et rénales. Dans son avis 2009-SA-0322, l'Afssa a réalisé un bilan des paramètres modifiés entre les lots traités et les lots contrôle et a estimé que ces variations hétérogènes, sans cohérences entre elles constituaient une parfaite illustration de la déconnexion entre les variations statistiquement significatives et leurs significations biologiques.

Bibliographie de l'annexe 4

Afssa 2003-SA-0047, Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de la mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié tolérant au Roundup Ready lignée NK 603 en vue de son utilisation comme tout autre maïs, à l'exclusion de la culture, sur le territoire de l'Union européenne, au titre de la directive 2001/18/CE, le 7 mars 2003 <http://www.anses.fr/Documents/BIOT2003sa0047.pdf>

Afssa 2003-SA-0242, Examen des compléments d'information en réponse aux objections des Etats membres relatifs à un dossier d'autorisation de la mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié tolérant au Roundup Ready lignée NK 603 en vue de son utilisation comme tout autre maïs, à l'exclusion de la culture, sur le territoire de l'Union européenne, au titre de la directive 2001/18/CE, le 5 janvier 2004. <http://www.anses.fr/Documents/BIOT2003sa0242.pdf>

⁵⁹ Aucun effet toxique n'a été mis en évidence à des doses supérieures à 572 mg/kg p.c. pour CP4EPSPS et 817mg/kg p.c. pour CP4EPSPS L214P (toxicité aiguë par administration unique chez la souris)

Afssa 2003-SA-0027, Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au rapport d'évaluation initiale établi par les autorités néerlandaises concernant la mise sur le marché de grains et de produits dérivés de maïs de la lignée NK 603 résistant au glyphosate (Roundup Ready) au titre du règlement 258/97, le 21 février 2003.

<http://www.anses.fr/Documents/BIOT2003sa0027.pdf>

Afssa 2003-SA-0401 Examen des compléments d'information en réponse aux objections des Etats membres relatifs à un dossier d'autorisation de la mise sur le marché de grains et de produits dérivés de grains de maïs génétiquement modifié tolérant au Roundup Ready lignée NK 603 au titre du règlement (CE) n°258/97, le 13 janvier 2004

<http://www.anses.fr/Documents/BIOT2003sa0401.pdf>

Afssa 2009-SA-0322 Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à son auto-saisine sur l'article publié dans 'International Journal of Biological Sciences' et intitulé 'A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health', le 5 février 2010.

<http://www.anses.fr/Documents/BIOT2009sa0322.pdf>

EFSA, 2003 Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from herbicide-tolerant genetically modified maize NK603, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto¹ Opinion adopted on 25 November 2003 The EFSA Journal (2003) 9, 1-14

EFSA, 2003 Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms on applications (EFSA-GMONL-2005-22 and EFSA-GMO-RX-NK603) for the placing on the market of the genetically modified glyphosate tolerant maize NK603 for cultivation, food and feed uses and import and processing, and for renewal of the authorisation of maize NK603 as existing product. The EFSA Journal (2009) 1137, 1-50.

Spiroux de Vendômois J. S., Roullier F., Cellier D., Séralini, G. E. 2009 A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health. *International Journal of Biological Sciences* 5(7), 706-726.

Annexe 5

Inventaire des publications relatives à des études de toxicité sub-chronique par administration orale pendant 90 jours réalisées dans le cadre de l'évaluation de la sécurité des PGM

References and title	GMP	Newly expressed proteins	tested material and incorporation rates	Treatments	Rats strain number of rat/treatment group/sex	Results
Appenzeller <i>et al.</i> , 2008 Subchronic feeding study of herbicide-tolerant soybean DP-356043-5 in Sprague-Dawley rats. Food and Chem. Tox. 46 2201-2213.	HT genetically modified Soybean DP-356043-5	GAT GM-HRA	toasted meal (20% w/w) and ground hulls (1.5% w/w).	6 groups : -GM soybean 356043 -GM soybean 356043 treated intended herbicides -near-isoline control, -3 non transgenic commercial varieties	Sprague Dawley 12	No adverse effects
Appenzeller <i>et al.</i> , 2009a Subchronic feeding study with GM stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-1507-1xDAS-59122-7) maize grain. Food and Chem. Tox. 47 1512-1520.	HT and IR genetically modified Maize 1507x59122	Cry1F PAT Cry1Ab34 Cry1Ab35 PAT	Maize grain (34%w/w)	6 groups : -GM maize 1507x59122 - near-isoline control - 3 non transgenic commercial varieties	Sprague Dawley 12	Grain from 1507x59122 maize is as safe and nutritious as that obtained from non-GM maize
Appenzeller <i>et al.</i> , 2009b Subchronic feeding study of grain from herbicide tolerant maize DP-98140-6 in Sprague Dawley rats. Food and Chem. Tox. 47 2269-2280.	HT genetically modified Maize 98140	GAT	Maize grain (35 and 38% w/w)	6 groups: -GM maize 98140 -GM maize 98140 treated intended herbicide - near-isoline control - 3 non transgenic commercial varieties	Sprague Dawley 12	No adverse health effects
Dryzga <i>et al.</i> , 2007 Evaluation of the safety and nutritional equivalence of a GM cottonseed meal in a 90 day dietary toxicity study in rats. Food and Chem. Tox. 45 1994-2004.	IR and HT genetically modified cotton	Cry1F Cry1Ac PAT	Meals (10% concentration)	5 groups -GM Widestrike -near-isoline control -3 non transgenic commercial varieties	Sprague Dawley 12	Lack of any toxicity of GM Widestrike cottonseed

References and title	GMP	Newly expressed proteins	tested material and incorporation rates	Treatments	Rats strain number of rat/treatment group/sex	Results
Hammond et al., 2004 Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. Food and Chem. Tox. 42 1003-1014.	HT genetically modified maize NK603	CP4 EPSPS	Maize grain (11 and 33%)	10 groups -11 or 33% GM maize -11 or 33% near isoline control -6 non transgenic commercial varieties 33%	Sprague Dawley 20	This study confirms ROUNDUP ready corn grains is as safe and nutritious as existing commercial corn hybrids.
(Hammond, Dudek et al. 2006) Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn. Food and chem. Tox. 44 1092-1099	IR genetically modified maize MON810	Cry1Ab	Maize grain (11 and 33%)	10 groups -11 or 33% GM maize -11 or 33% near isoline control -6 non transgenic commercial varieties 33%	Sprague Dawley 20	MON810 is considered to be substantially equivalent to, and as safe and nutritious as, conventional corn varieties.
(Hammond, Dudek et al. 2006) Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from rootworm-protected corn. Food and chem. tox. 44 147-160	IR genetically modified maize MON863	Cry3Bb1 NptII	Maize grain (11 and 33%)	10 groups -11 or 33% GM maize -11 or 33% near isoline control -6 non transgenic commercial varieties 33%	Sprague Dawley 20	MON863 is considered to be substantially equivalent to, and as safe and nutritious as, conventional corn varieties.
(Hammond, Lemen et al. 2008) Safety assesement of SDA soybean oil: Results of a 28-day study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats. Regul. Tox.and Pharmacol. 52, 311-323.	SDA genetically modified soybean (rich in stearidonic-acid)	$\Delta 6$ and $\Delta 15$ desaturases	Soybean oil 4 g/kg body weight	4 groups -4g or 1.5g SDA soybean oil (GM) -4g near isogenic control soybean oil -4 g menhaden oil	Sprague Dawley 25	The result of the 90 day/one generation reproduction feeding study found no evidence of treatment related adverse effects up to the highest dosages of SDA soybean oil tested.
(He, Huang et al. 2008) Comparison of grain from corn rootworm resistant T DAS -59122-7 maize with non-T maize grain in a 90 day feeding study in sprague dawley rats. Food and Chem. Toxicol. 46 1994-2002.	IR and HT genetically modified maize DAS-59122	Cry34Ab1 Cry35Ab1 PAT	Maize flour (50% and 70%)	5 groups -50 or 70% GM maize 59122 -50 or 70% near isoline control maize -43,3% maize flour (=control diet)	Sprague Dawley 10	The results demonstrated that it was as safe and nutritious as non-transgenic maize grain

References and title	GMP	Newly expressed proteins	tested material and incorporation rates	Treatments	Rats strain number of rat/treatment group/sex	Results
(He, Tang et al. 2009) A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain(Y642) in sprague Dawley rats, Food and Chem. Toxicol. 47 425-432.	Lysine-rich genetically modified maize (Y642)	sb401 (a gene from potatoes)	Maize grain (30 and 76%)	5 groups: -30% and 76% GM Y642 -30% and 76% near isoline control maize -43,3% maize flour (=control diet)	Sprague Dawley 10	The results demonstrated that Y642 is as safe and nutritious as conventional non-GM maize grain
(Healy, Hammond et al. 2008) Results of a 13-week safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate-tolerant MON87017 corn. Food and chem. Toxicol. 46 2517-2524.	IR and HT genetically modified Optimum GAT maize MON87017	Cry3Bb1 CP4EPSPS	Grain (11 and 33%)	9 groups : -11% and 33% GM MON87017 -11% and 33% near isogenic control -6 non transgenic commercial varieties 33%	Sprague Dawley 20	No adverse health effects were detected in rats following 13 weeks of dietary exposure to grain from genetically modified Optimum GAT maize.
(Malley, Everds et al. 2007) Subchronic feeding study of DAS-59122-7 maize grain in Spague-Dawley rats, Food and Chem. Tox. 45 1277-1292.	IR and HT genetically modified maize DAS-59122	Cry34Ab1 Cry35Ab1 PAT	Grain (35%)	5 groups -35% GM maize DAS-59122 - 35% non transgenic near isogenic control 1 variété commerciale - - 2 non transgenic commercial varieties 35%	Sprague Dawley 12	Results from the current study demonstrated that 59122 maize grain is as nutritious and wholesome as conventional maize grain when evaluated in a subchronic feeding study in rats.
(Poulsen, Kroghsbo et al. 2007) A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin Galanthus nivalis (GNA) Food and Chem. Tox. 45 350-363.	Genetically modified Rice GNA (expressing lectin galanthus nivalis)	GNA lectin galanthus nivalis	Rice flour	2 groups : 60% GM rice GNA 60% control parental rice	Wistar 16	In the present study several differences were observed between rats fed diets with GM and parental rice. Most of these differences appeared to be related to the increased water intake of the rats fed GM rice, which probably relates to the GNA lectin content, but none of the effects were considered to be adverse.

References and title	GMP	Newly expressed proteins	tested material and incorporation rates	Treatments	Rats strain number of rat/treatment group/sex	Results
Liu et al. 2012 A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats. Food and Chem. Tox. 50 3215-3221.	IR genetically modified maize	Cry1Ac_M	Maize	7 groups 12.5, 25, 50% GM maize 12.5, 25, 50% non GM maize Maize commercial line	Sprague Dawley 10	Safe as conventional
(Schroder, Poulsen et al. 2007) A 90-day safety study of genetically modified rice expression Cry1Ab protein (Bacillus thuringiensis toxin) in Wistar rats. Food and Chem. Tox. 45 339-349.	IR genetically resistant Rice (KMD1)	Cry1Ab	Rice flour	2 groups : 60% GM rice KDM1 60% non-transgenic parental wild type rice	Wistar 16	The results show no adverse or toxic effects of KDM1 rice when tested in the design used in this 90-day study.
(Wang, Wang et al. 2002) Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic <i>cry1Ab</i> gene from bacillus thuringiensis. J. Sci. Food Agric. 82 738-744.	IR genetically resistant Rice (KMD1)	Cry1Ab	Rice flour	4 groups : 64% GM rice KDM1 32% GM rice KDM1 16% GM rice KDM1 64% non-transgenic parental wild type rice	Sprague Dawley 10	KDM1 rice flour was safe to rats in general.
Zhu et al 2012 A 90-day feeding study of glyphosate-tolerant maize with the G2-aroA gene in Sprague-Dawley rats. Food and Chem Tox 18. S0278-6915	HT genetically modified maize	G2-AroA gene	Maize	7 groups 12.5, 25, 50% GM maize 12.5, 25, 50% non GM maize Maize commercial line	Sprague Dawley 10	Safe and nutritious
Zhou et al 2011 A 90-day toxicology study of high-amylose transgenic rice grain in Sprague-Dawley rats. Food Chem Tox, 2011 49(12):3112-3118.	High amylose	RNAi	Rice	3 groups 70% GM 70% isogenic Control diet	Sprague Dawley	as safe as the conventional non-transgenic rice for rat consumption

IR : Insect resistant
HT : Herbicide tolerant

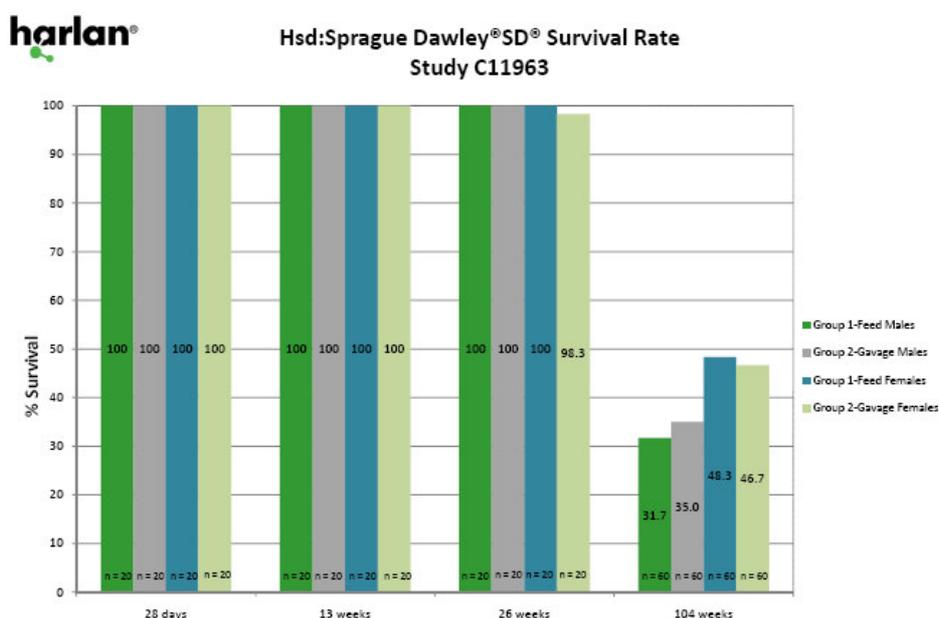
Annexe 6

Comparaison avec les données de la littérature des taux de mortalité et incidences des tumeurs de l'étude de Séralini *et al.* (2012)

Mortalité (Figure 1 et tableau 1)

Le tableau 1 et la figure 1 montrent les mortalités décrites dans la littérature sur des rats Sprague Dawley, souche utilisée dans l'expérience de Séralini *et al.* (2012) (Chandra *et al.* 1992; Dinse *et al.* 2010; Nakazawa *et al.* 2001; Prejean *et al.* 1973). Séralini *et al.* (2012) observent 2 morts précoces (mâles - 100 jours 11% GMO et 120 jours 22% GMO + R) dont les causes exactes ne sont pas précisées. La littérature rapporte quelques rares cas d'apparition de tumeurs mammaires avant 140 jours (Kuzutani, 2012).

Figure 1 : Mortalité des rats Sprague Dawley de la société Harlan ayant fourni les rats pour l'étude de Séralini *et al.*, (2012).



Incidence des tumeurs (Tableau 2, 3, 4, 5)

Chez les femelles, il est décrit dans la littérature une incidence élevée des tumeurs mammaires et hypophysaires. Ce constat correspond aux observations rapportées par Séralini *et al.* (2012).

Par contre, chez les mâles plusieurs études montrent une incidence élevée des tumeurs du testicule, de la peau et des surrénales (Chandra, Riley 1992, Nakazawa 2001). La publication de Séralini *et al.* (2012) ne fait pas mention de tumeurs dans ces organes. L'incidence des tumeurs du foie et du rein est très faible chez les rats Sprague Dawley (Chandra, Riley 1992, Nakazawa 2001). Il est difficile d'évaluer et de comparer ces résultats aux observations de Séralini *et al.* (2012). En effet, l'article de Séralini *et al.* (2012) fait état de pathologies du foie et du rein sans préciser si elles sont d'origine tumorale.

Tableau 1 : Pourcentage des mortalités des rats Sprague Dawley

	Prejean (1973) (77 semaines ou 540 jours) 180 rats/sexe	Nakazawa (2001) Gpe A et B 120/sexe	Chandra (1992) 2 ans 1340 mâles 1329 femelles	Iffa Crédo 105 semaines ou 2ans) 100 rats/sexe	Dinse (2010) 2 ans 330 femelles
mâles	33%	A 11% B 24%	51%	50%	
femelles	58%	A 58% B 65%	54%	35%	28-51%

Tableau 2 : Fréquence en % des tumeurs observées chez les rats Sprague Dawley des publications Nakazawa (2001) et Chandra (1992)

Organes	Sprague-Dawley Shizuoka Japon Nakazawa et al 2001			Sprague-Dawley Charles River Chandra et al 1992		
	Mâle (240)	Femelle (240)	Total (480)	Mâle (1340)	Femelle (1329)	Total (2669)
Foie	3,33 (8)	2,08 (5)	5,41 (13)	2,6(35)	0,83(11)	1,7(46)
Hypophyse	36,67 (88)	69,59 (167)	53 (255)	27,8 (373)	49,4(659)	38,6 (1032)
Glande mammaire	—	32,92 (79)	32,92 (79)	1,5(20)	31,6(420)	
Reins	1,25 (3)	0,83 (2)	1 (5)	0,97(13)	0,45(6)	0,7(19)
Surrénale	12,92(31)	10 (24)	11,4(55)	6,1(82)	3 (40)	4,6(122)

Tableau 3 : Fréquence en % des tumeurs observées chez les rats Sprague Dawley et les souris Swiss de la publication Prejean et al 1973.
(Effectif des groupes) Analyse à 540 jours

Organes	Sprague-Dawley Charles River Prejean et al (1973)			Souris Swiss Charles River Prejean et al (1973)		
	Mâle (179)	Femelle (181)	Total (360)	Mâle (101)	Femelle (153)	Total (254)
Foie	0	0	0	2(2)	0	0,8 (2)
Hypophyse	16,2 (29)	29,3 (53)	22,8 (82)	0	1,9 (3)	1,2(3)
Glande mammaire	2,2 (4)	32 (58)	17,2 (62)	1(1)	1,9(3)	1,6(4)
Reins	0	0	0	2(2)	0	0,8(2)
Surrénale	7,8(14)	10 (18)	8,8(32)	1(1)	0	0,4 (1)

Tableau 4 : Fréquence en % des tumeurs observées chez les rats Sprague Dawley et les rats Fisher 344/N des publications Dinse *et al.* (2010) et Brix *et al.* (2005)

(Effectif des groupes) Analyse sur 2 ans

	Sprague-Dawley Harlan Dinse <i>et al.</i> (2010)	Sprague-Dawley Harlan Brix <i>et al.</i> (2005)	Fischer 344/N Harlan Dinse <i>et al.</i> (2010)
Organes	Femelles (473)	Femelles (371)	Femelles (450)
Foie	1,27 (4)	1,3 (5)	0,89 (4)
Hypophyse	40,55 (191)	42,3 (157)	45,77 (206)
Glande mammaire	80,1 (379)	85,2 (316)	52,88 (238)
Reins	1,47 (7)	0,6 (2)	0,22 (1)
Surrénale	9,35 (44)	1,1(4)	3,78 (17)

Tableau 5 : Incidence en % d'apparition de tumeur de la glande mammaire chez les Sprague Dawley. % (nombre d'animaux concernés/nombre d'animaux total)

Glande mammaire			
	Mâle	Femelle	Origine
Okada et al (1981)		20,3(13/64)* 75,8(72/95)**	JCL Japon
Chandra et al (1992)	1,5(20/1340)	31,6(420/1329)	Charles River
Nakazawa et al (2001)		32,9(79 /240)	Japan SLC
Brix et al (2005)		85,2(316/371)	Harlan
Dinse et al (2010)		80,1(379/473)	Harlan
Séralini et al (2012)		50(5/10)	Harlan
Harlan (2012)	3,4(4/~120)	91,6(109/~120)	Harlan

- ; *420 jours ; ** - 756 jours

Bibliographie annexe 6

Chandra M, *et al.* (1992) Spontaneous neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Archives of Toxicology* **66**(7), 496-502.

Dinse GE, *et al.* (2010) Comparison of NTP historical control tumor incidence rates in female Harlan Sprague Dawley and Fischer 344/N Rats. *Toxicologic Pathology* **38**(5), 765-75.

Kuzutani K, *et al.* (2012) Spontaneous Mammary Adenocarcinoma in a Twelve-week-old Female Sprague-Dawley Rat. *J Toxicol Pathol* **25**(3), 221-4.

Nakazawa M, *et al.* (2001) Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Experimental Animals* **50**(2), 99-103.

Okada M, *et al.* (1981) Characteristics of 106 spontaneous mammary tumours appearing in Sprague-Dawley female rats. *British Journal of Cancer* **43**(5), 689-695.

Prejean JD, *et al.* (1973) Spontaneous tumors in Sprague Dawley rats and Swiss mice. *Cancer Research* **33**(11), 2768-2773.

Annexe 7

Voie métabolique de l'acide shikimique

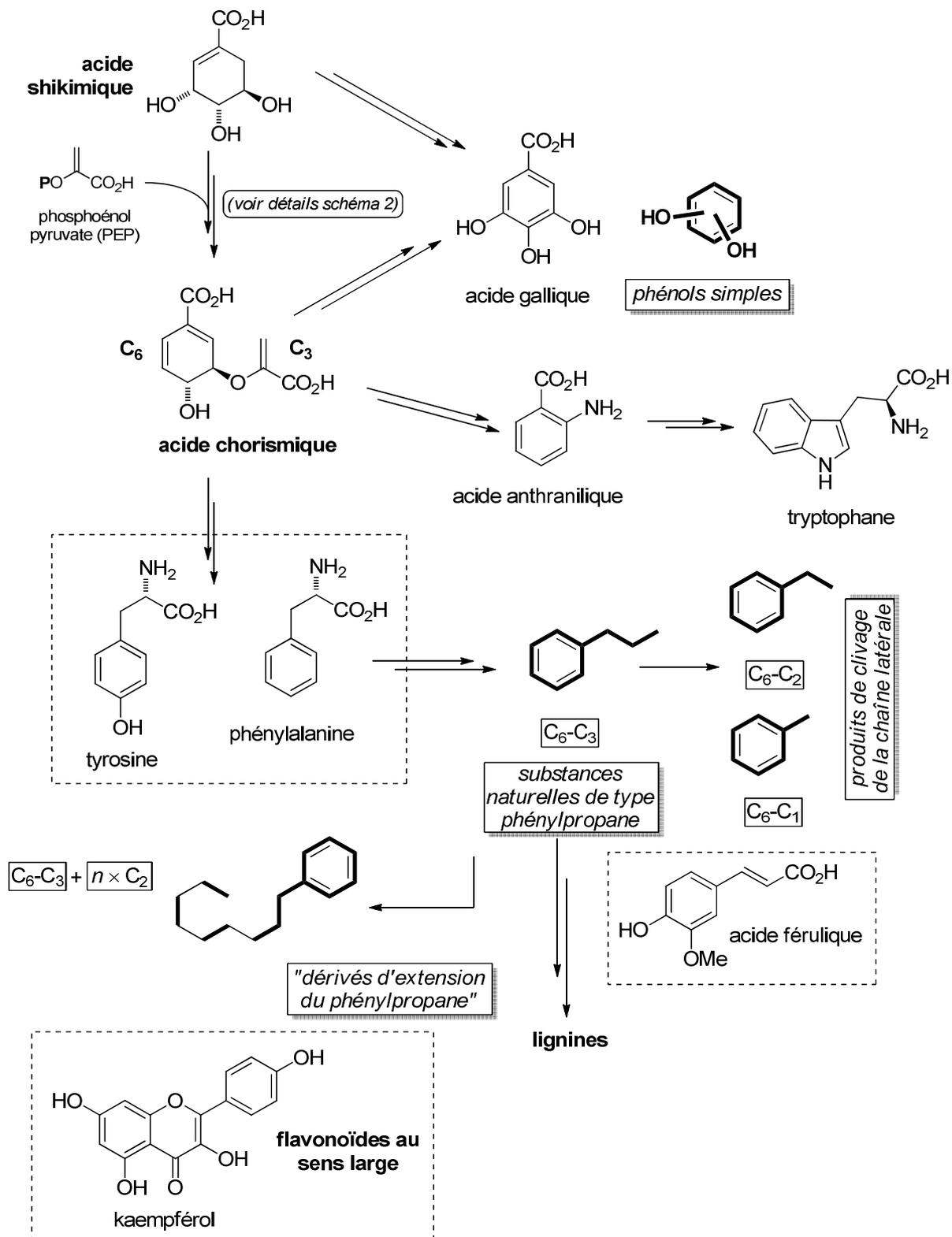


Schéma 1 - Résumé de la voie de l'acide shikimique.

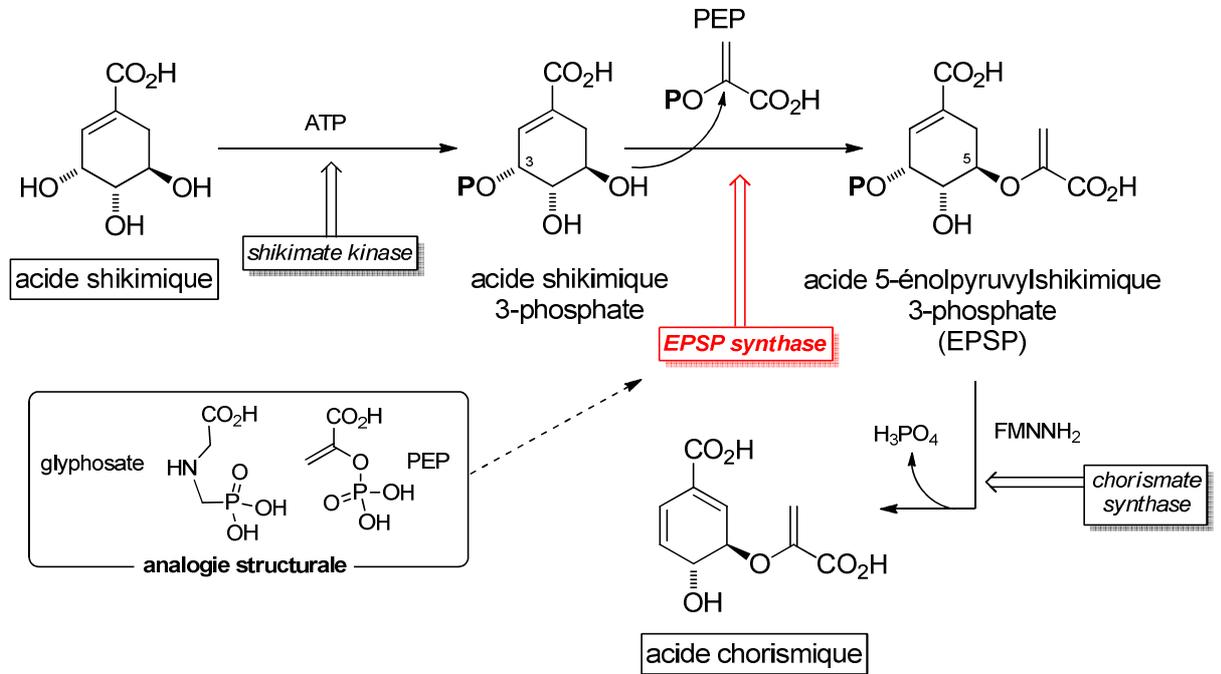


Schéma 2 - Place de l'EPSP synthase dans le métabolisme de l'acide shikimique.