

## **OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ?**

---

**Étude au travers de 4 exemples :**

**Les plantes résistantes à des insectes  
La betterave tolérante au glyphosate  
L'enrichissement en vitamine A : cas du riz doré  
Des microorganismes génétiquement modifiés**

## METHODE DE TRAVAIL ET LISTE DES AUTEURS

---

Dans le prolongement du colloque organisé par l'afssa en décembre 2001 sur "OGM et alimentation, peut-on évaluer des bénéfices pour la santé ?", des membres du comité d'experts spécialisé "Biotechnologie" ont entrepris la rédaction d'un rapport analysant en détail quatre cas d'OGM susceptibles d'apporter des bénéfices en matière de santé au regard des produits conventionnels :

<b>Monsieur Louis-Aimé AUMAITRE</b>	Station de recherche porcine, INRA – Saint-Gilles
<b>Monsieur Pierre BESANÇON</b>	Laboratoire de génie biologique et sciences des aliments, Université de Montpellier II - Montpellier
<b>Monsieur Michel BRANCHARD</b>	Institut de sciences agroalimentaires - Plouzané
<b>Monsieur Gérard BRANLARD</b>	Qualité et génétique des blés, INRA - Auzeville
<b>Monsieur Gérard CORTIER</b>	Centre de recherche de Jouy, INRA – Jouy en Josas
<b>Monsieur Joël GUILLEMAIN</b>	Sesame – Chambray-les-Tours
<b>Monsieur Louis-Marie HOUEBINE</b>	Unité de différenciation cellulaire, INRA - Jouy en Josas
<b>Monsieur Philippe JOUDRIER</b>	Unité de biochimie et biologie moléculaire des céréales - INRA - Montpellier
<b>Monsieur Nicolas LINDLEY</b>	Département de génie biochimique et alimentaire, INSA - Toulouse
<b>Monsieur Guy MOULIN</b>	Laboratoire de microbiologie industrielle et de génétique des micro-organismes, ENSAM - Montpellier
<b>Monsieur Alain PARIS</b>	Laboratoire des xénobiotiques, INRA - Toulouse
<b>Monsieur Thierry PINEAU</b>	Laboratoire de pharmacologie toxicologique INRA - Toulouse
<b>Monsieur Alain RAYNAL</b>	Université Paris-Sud - Orsay
<b>Monsieur Jean Pierre ZALTA</b>	Institut de biologie cellulaire et de génétique, CNRS - Toulouse

En octobre 2003, le comité d'experts spécialisé "Biotechnologie" a été renouvelé. Quelques uns des nouveaux membres de ce comité ont procédé à la relecture approfondie de cet ensemble de quatre documents et ont proposé plusieurs modifications :

<b>Madame Chantal BARTHOMEUF</b>	Service de pharmacognosie et biotechnologies UMR - INSERM 484 – Clermont-Ferrand
<b>Madame Francine CASSE</b>	Université Montpellier II - Montpellier
<b>Monsieur Didier MONTET</b>	CIRAD - Montpellier
<b>Monsieur Henry-Eric SPINLER</b>	INA-PG, GER de Technologie et Procédés Alimentaires - THIVERVAL GRIGNON
<b>Madame Maria URDACI</b>	Laboratoire de microbiologie et biochimie appliquée, ENITA - Bordeaux

A plusieurs reprises, le comité dans son ensemble a examiné et amendé ce rapport, le nouveau comité ayant entrepris d'en rédiger l'introduction et la conclusion. Au cours de sa réunion du 13 mai 2004, le comité d'experts spécialisé "Biotechnologie" a adopté ce rapport.

La coordination scientifique et la mise en forme de ce document ont été assurées par Monsieur Maxime SCHWARTZ, président du CES, et Madame Sophie GALLOTTI, coordinateur scientifique.

<b>INTRODUCTION</b>	5
<b>LES PLANTES RESISTANTES A DES INSECTES</b>	
1 Introduction	7
2 Les moyens de lutte contre les ravageurs (insectes)	8
2.1 Utilisation d'insecticides	8
2.2 Lutte biologique	10
2.3 Gènes Bt	11
3 Cultures du maïs Bt et conséquences agronomiques	11
3.1 Evolution des surfaces cultivées	11
3.2 Prise en compte des problèmes de résistance	11
3.3 Lutte contre d'autres ravageurs en maïsiculture	12
3.4 Conséquences sur l'entomofaune des variétés de maïs Bt	12
4 Gène Bt et niveaux de contamination en mycotoxines chez le maïs-grain	12
4.1 Mycotoxines du maïs : organismes sources, contamination et diversité des toxines	13
4.2 Effets pathologiques, dangerosité, synergie d'effets et détoxification	13
4.3 Données normatives et réglementaires, influence du climat et des pratiques culturales	14
4.4 Surexpression de la toxine Bt et incidence sur la contamination en mycotoxines du maïs	15
4.5 Qualité des produits animaux	17
5 Conclusions	18
Références bibliographiques	20
Annexe : Papillon Monarque et maïs Bt (avec références)	24
<b>LA BETTERAVE TOLERANTE AU GLYPHOSATE</b>	
1 Observations préliminaires sur le choix de cette production	27
2 Rappels sur la production de la betterave	27
3 Pourquoi désherber la culture de betterave ?	28
4 Les herbicides classiquement utilisés	28
5 La betterave OGM	29
6 Mode d'action du glyphosate	30
7 Comparaison des effets des herbicides conventionnels et du glyphosate	30
7.1 Sur le mode d'action de ces herbicides	30
7.2 Sur les conséquences résultant d'un lessivage	31
7.3 Sur la contamination de l'air	32
7.4 Sur la bio-accumulation des substances	33
8 Avantages de la betterave tolérante au glyphosate	33
9 Glyphosate et environnement	33
10 Conclusion	33
Références bibliographiques	35

## **L'ENRICHISSEMENT EN VITAMINE A : CAS DU "RIZ DORE"**

1	Place du riz dans l'alimentation -----	37
2	Besoins et carences en vitamine A-----	37
2.1	Contexte général -----	37
2.2	Sources de vitamine A -----	37
2.3	Métabolisme, bioconversion de la provitamine A en vitamine A-----	38
2.4	Biodisponibilité -----	38
2.5	Stabilité -----	38
2.6	Besoins -----	39
2.7	Carence en vitamine A -----	39
2.8	Hypervitaminose A -----	39
3	Stratégies de lutte contre la carence en vitamine A-----	40
3.1	Supplémentation médicamenteuse -----	40
3.2	Les approches alimentaires-----	41
4	Obtention d'un riz enrichi en provitamine A par voie biotechnologique : le "riz doré"-----	42
5	Efficacité du "riz doré" -----	43
6	Conclusions et perspectives -----	45
	Références bibliographiques-----	47

## **ANALYSE PROSPECTIVE DES EVENTUELS EFFETS BENEFIQUES DE MICROORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES (MGM) : BACTERIES ET LEVURES**

1	Le point sur la consommation actuelle de microorganismes vivants non MGM-----	49
2	Utilisation actuelle des microorganismes génétiquement modifiés -----	50
3	Vers les bactéries "médicament"-----	50
4	Une approche dans un objectif d'alimentation humaine -----	52
4.1	Produits de panification, d'oénologie et de brasserie -----	52
4.2	Produits laitiers-----	53
5	Alimentation du bétail-----	54
6	Technologie de la chimie verte et la bioremédiation -----	55
7	Sécurité sanitaire et probiotiques MGM-----	56
7.1	Dangers et risques potentiels -----	57
7.2	Maîtrise des dangers et risques -----	57
	Références bibliographiques-----	59

## **RESUME ET CONCLUSIONS-----65**

Toute avancée technologique comporte des risques et la transgénèse végétale n'échappe pas à cette règle. Que ces risques soient faibles ou élevés, la population ne peut les accepter que si l'avancée technologique apporte des bénéfices. Il importe donc de faire un bilan du rapport bénéfices/risques. Or, dans le cas des plantes transgéniques, exemples les plus largement connus d'organismes génétiquement modifiés ou OGM, seuls les risques sont mis en avant, sans que l'on s'interroge suffisamment sur les bénéfices. Cela est en grande partie dû au fait que les plantes transgéniques actuellement sur le marché ont été conçues dans un but essentiellement économique, pour faciliter la tâche et réduire les coûts de production des agriculteurs et permettre un profit augmenté pour les firmes commercialisant ces variétés végétales. Le consommateur, qui voit dans les OGM un risque possible pour sa santé, ou pour l'environnement, n'y trouve pas son compte. Il ne voit décidément pas ce que ces OGM lui apportent actuellement. Il n'envisage pas les OGM en terme de bénéfice/risque mais uniquement en terme de risque.

Conscients de cette difficulté, les producteurs d'OGM ont alors mis en avant des bénéfices probables de ces OGM pour la santé. En outre, ils ont fait valoir que d'autres plantes transgéniques, dites de "deuxième génération", pourraient être conçues non pas dans un seul but économique, mais également dans celui d'apporter des bénéfices pour la santé des consommateurs, dans les pays industrialisés comme dans les pays en voie de développement.

Pour le comité d'experts spécialisé "Biotechnologie" de l'AFSSA, chargé de l'évaluation des risques liés à la consommation, tant par l'homme que par les animaux, des OGM et des produits dérivés, il convenait dès lors de tenter d'évaluer les bénéfices qui pourraient en résulter pour la santé.

En décembre 2001, l'AFSSA a donc organisé un colloque<sup>1</sup> "OGM et alimentation : peut-on évaluer les bénéfices pour la santé" qui visait à engager la réflexion sur ce thème. Afin d'approfondir cette réflexion, le comité "Biotechnologie" a ensuite entrepris d'analyser en détail quatre cas d'OGM susceptibles d'apporter des bénéfices en matière de santé au regard des produits conventionnels. Il a choisi de considérer deux cas d'OGM déjà sur le marché ou proche de l'être, initialement conçus à des fins principalement économiques mais pour lesquels des bénéfices pour la santé ont par la suite été allégués et deux cas d'OGM en cours d'évaluation, et conçus pour apporter des bénéfices pour la santé.

Le premier exemple est celui de plantes résistant spécifiquement à certains insectes ravageurs (mais sans effet sur les autres). A ce jour, plusieurs variétés de maïs et de coton résistant à des insectes et obtenues par introduction d'un gène issu d'une bactérie de l'environnement, *Bacillus thuringiensis*, sont cultivées dans le monde. Un premier avantage de ces variétés serait de limiter l'emploi des insecticides et donc l'exposition de la population humaine à ceux-ci. Un avantage connexe de cette résistance serait de limiter le développement sur les plantes de champignons produisant des mycotoxines dont certaines sont cancérigènes. Un examen critique de ces allégations est présenté.

Le deuxième exemple est celui de la betterave tolérante à un herbicide, le glyphosate, qui, bien qu'elle ne soit pas encore autorisée en Europe, a fait l'objet de nombreuses études et recherches, notamment sur l'impact environnemental au regard du transfert de gènes à des plantes adventices, mais également au regard des quantités d'herbicides utilisées et de leurs qualités par rapport à des variétés conventionnelles. Le présent document analyse les conséquences possibles sur la santé humaine de ces modifications dans l'usage des herbicides.

Le troisième exemple est celui du "riz doré", un riz potentiellement enrichi en précurseur de la vitamine A mais dont on ne dispose pas encore de variété fixée. Il s'agit là d'une plante transgénique conçue à des fins nutritionnelles et destinée à lutter contre une grave carence vitaminique très répandue dans les pays en voie de développement. C'est donc clairement un OGM destiné à apporter des bénéfices en matière de santé. Dans la mesure où cet OGM a été l'objet d'une polémique sur la réalité de son

---

<sup>1</sup> Les actes du colloque "OGM et alimentation, peut on évaluer les bénéfices pour la santé ?" organisé par l'AFSSA les 17 et 18 décembre 2001 sont consultables au format pdf sur le site [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)

intérêt en l'état actuel des recherches, le comité "Biotechnologie" a souhaité faire une analyse aussi objective que possible des bénéfices qu'il est censé apporter.

Le dernier chapitre concerne les microorganismes génétiquement modifiés en vue d'application nutritionnelle ou médicale. En effet, même si aucun OGM de ce type n'est encore sur le marché, plusieurs sont susceptibles de l'être à relativement court terme. Un bref inventaire des bénéfices qu'ils pourraient apporter a donc paru opportun.

# LES PLANTES RESISTANTES A DES INSECTES

---

## 1 INTRODUCTION

De très nombreuses souches de *Bacillus thuringiensis* ont été identifiées depuis près de 100 ans. Chacune d'elle produit des protéines, delta-endotoxines, ayant des propriétés insecticides, la spécificité vis-à-vis de la cible variant avec la souche [1,2]. Cette propriété doublée d'une biodégradabilité complète fait que les toxines *Bt*, sous forme bactérienne, ont été largement utilisées en lutte biologique depuis plusieurs décennies et sont encore très utilisées [3].

L'émergence depuis le début des années 80 de résistances à des insecticides de synthèse, le renforcement de la protection de l'environnement par une nécessaire diminution des quantités de pesticides utilisées, et, enfin, l'utilisation de nouvelles méthodes d'amélioration génétique des plantes intégrant les biotechnologies ont favorisé la création de nouvelles variétés de plantes à vocation agronomique exprimant un gène codant pour une protéine *Bt* de résistance aux insectes. Actuellement, les principales cultures concernées sont celles de maïs et de coton, celles de pomme de terre, de soja et de riz représentant encore des surfaces modestes.

De 1996 à 2002, le caractère de résistance à des insectes a constitué le deuxième trait dominant dans l'ensemble des cultures transgéniques cultivées de par le monde ( $58,7 \times 10^6$  ha) avec, en 2002, 17 % pour les cultures *Bt* ( $10,1 \times 10^6$  ha) et 8% ( $4,4 \times 10^6$  ha) pour les cultures combinant les caractères de résistance à des insectes et de tolérance à des herbicides [4]. Ce caractère se situe en 2<sup>ème</sup> position, derrière celui de la seule tolérance aux herbicides qui a concerné, pour l'année 2002, 75 % des surfaces de plantes génétiquement modifiées (PGM) mises en culture, soit  $44,2 \times 10^6$  ha [4]. Des différentes cultures *Bt*, c'est celle du maïs qui domine avec  $7,6 \times 10^6$  ha ensemencés essentiellement dans 7 pays ; elle représente 13% des surfaces cultivées en plantes transgéniques. Les cultures de cotonniers transgéniques présentant, seuls ou en association les caractères de tolérance à des herbicides et de résistance à des insectes, représentent 20% de la surface totale mondiale cultivée en 2002, sans augmentation par rapport à 2001 [4]. C'est la Chine, qui a contribué en 2002 pour 4% de l'ensemble mondial des cultures de PGM à la plus forte croissance des surfaces cultivées. En effet, les surfaces de cotonniers *Bt* y ont augmenté de 40 % par rapport à 2001, occupant ainsi plus de la moitié de la superficie totale de cotonniers cultivés dans le pays et concernant plus de 5 millions de petits agriculteurs [4]. En Europe, l'Espagne commence à cultiver des cotonniers résistants à des insectes.

En 2003, les surfaces consacrées aux OGM ont augmenté de 15 % pour atteindre un total de 67,7 millions d'ha. Cette augmentation est principalement due aux USA (+ 9,7 %), au Canada (+ 25,7 %) à la Chine (+ 33 %) et surtout au Brésil qui n'était pas comptabilisé antérieurement et dont les surfaces représentent 3 millions d'ha (<http://www.isaaa.org/>).

Ces données statistiques mondiales relatives aux plantes transgéniques cultivées, et en particulier de maïs ou de cotonnier *Bt*, sont depuis quelques années très significatives en comparaison des cultures conventionnelles encore dominantes, le taux de croissance annuelle des cultures de PGM depuis 1996 étant supérieur à 10 % [4]. Elles intéressent à présent un nombre croissant d'agriculteurs.

Compte tenu de cette évolution récente dans les pratiques agricoles et, au-delà des conséquences agronomiques et économiques positives déjà bien documentées, celles qui existent en terme de qualité de denrées alimentaires issues des variétés de plantes génétiquement modifiées cultivées devraient désormais apparaître clairement :

- soit comme conséquence directe de la réduction de la quantité d'insecticides utilisée sur la diminution pour les agriculteurs des risques inhérents à leur manipulation et sur la diminution des résidus d'insecticides retrouvés à la récolte,
- soit comme conséquence indirecte liée, dans le cas du maïs, à une meilleure protection des grains vis-à-vis des attaques d'insectes qui se traduirait par une meilleure qualité sanitaire des grains liée à une réduction des contaminations en mycotoxines.

De même, la qualité sanitaire des sous-produits de la récolte de coton tels que la graine ou le tourteau destinés à l'alimentation animale s'en trouverait améliorée par une diminution de résidus d'insecticides présents.

## **2 LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES RAVAGEURS (INSECTES)**

### **2.1 UTILISATION D'INSECTICIDES**

#### **2.1.1 Maïs**

Même si en pratique, elle concerne des surfaces relativement limitées, la lutte chimique contre les attaques d'insectes est le moyen le plus fréquemment utilisé en maïsiculture. Les insecticides employés sont principalement des organophosphorés (chlorpyrifos), des carbamates ou des pyréthrinoides. Leur efficacité peut permettre de limiter les pertes en rendement à 5-10% contre 30-50% en cas d'absence de traitement. Les précautions d'emploi des produits chimiques, doivent être respectées pour éviter tout contact avec la peau, l'appareil respiratoire et les yeux et tout risque d'intoxication des manipulateurs ou de toute personne mise en contact accidentellement avec ces produits.

Les modes d'utilisation sont conditionnés par le parcellaire et le stade végétatif du maïs et doivent tenir compte des périodes de ponte des insectes, difficiles à définir du fait d'un étalement et d'une multiplication dans le temps. Les traitements insecticides doivent être réalisés avant que les larves de la pyrale ne s'installent dans les tiges ou celles de la chrysomèle dans les racines et ne deviennent ainsi invulnérables. Les moyens mis en œuvre pourront aller du traitement par pulvérisation, par aspersion au traitement aérien. Toutes ces difficultés limitent de fait l'efficacité des traitements effectués sur culture de maïs.

L'utilisation d'insecticides chimiques a par ailleurs pour conséquence d'éliminer une entomofaune auxiliaire utile intervenant dans la lutte contre d'autres insectes nuisibles pour la culture tels que les acariens phytophages ou les pucerons. Ces derniers peuvent par ailleurs être aussi vecteurs dans la transmission des virus de la jaunisse nanisante de l'orge ou de la mosaïque nanisante du maïs se traduisant par des chutes de rendements de l'ordre de 10% [5], et nécessitant, dans certains cas, un traitement insecticide complémentaire (imidaclopride).

La lutte chimique peut s'effectuer préventivement au semis en utilisant des semences enrobées contenant les produits tels que l'imidaclopride ou le fipronil<sup>2</sup> ou sur semences non enrobées avec l'apport dans le puits de semis de granulés contenant un insecticide de type carbamate (carbofuran). Les traitements sur la plante en végétation se font en fonction de l'importance des attaques d'insectes. Au stade plantule ou en post-floraison, les traitements par pulvérisation terrestre ou aérienne utilisent des pyréthrinoides (deltaméthrine, cyperméthrine).

Aux Etats-Unis, la lutte chimique vis-à-vis de ces insectes ne porte que sur 5% des surfaces de maïs. Ceci est dû principalement à la difficulté de déterminer le meilleur moment pour traiter la pyrale ou les chrysomèles des racines du maïs. De ce fait, l'introduction de variétés de maïs Bt ne se traduit pas par une réduction importante des tonnages d'insecticides pulvérisés [6].

#### **2.1.2 Cotonnier**

La lutte contre les insectes ravageurs des cultures de coton nécessite le recours à de fréquents traitements insecticides. Généralement, de 2 à 10 traitements sont nécessaires. Mais Huang *et al* [7] rapportent qu'en conditions de culture conventionnelle (application manuelle des pesticides) en Chine, le nombre de traitements insecticides peut atteindre une vingtaine en raison d'une accélération des générations d'insectes en climat tropical, la quantité de produits répandus pouvant atteindre 55 kg/ha, tous conditionnements confondus. A la suite de l'introduction de nouvelles variétés modifiées génétiquement pour résister aux attaques d'insectes, la quantité de produits insecticides répandus et le nombre de traitements ont été divisés par 3. L'emploi de produits à base d'organochlorés ou d'organophosphorés tend à disparaître. Ceci a des implications directes sur les problèmes de santé

<sup>2</sup> sans préjudice des mesures prises récemment à l'encontre de ces substances



des manipulateurs de produits phytosanitaires. Parmi les cultivateurs qui n'utilisent pas de variétés de cotonnier résistantes aux insectes, 30 % manifestent des problèmes de santé lors des pulvérisations contre seulement 9 % des cultivateurs utilisant le cotonnier Bt.

En Inde, l'emploi de 50 % de variétés de cotonnier Bt entraînerait une diminution des quantités de produits insecticides pouvant atteindre 9200 tonnes par an [6].

Aux Etats-Unis, la réduction de la quantité d'insecticide entre 1995, année qui a précédé l'introduction des variétés Bt, et 1999 est estimée à 1200 tonnes, soit 14 % de la quantité totale utilisée, le nombre de traitements ayant diminué de 22 % [8]. Cette diminution nette de l'utilisation d'insecticides est confirmée par d'autres auteurs [9].

### 2.1.3 Evaluation toxicologique des principaux insecticides

- **Deltaméthrine, cyperméthrine**

Ces composés appartiennent à la classe des Pyréthriinoïdes de type II [10] et interviennent au niveau du système nerveux de l'insecte pour perturber l'action du neurotransmetteur GABA. Ils agissent par contact ou après ingestion.

- **Deltaméthrine** [11]

En administration orale unique (toxicité aiguë), la DL<sub>50</sub> varie de 31 à 139 mg/kg chez le rat, et de 21 à 34 mg/kg chez la souris. Les signes d'intoxication sont similaires à ceux provoqués par les autres pyréthriinoïdes : mastication, salivation, agitation des membres, convulsions, paralysie et mort. Chez l'homme, les signes d'empoisonnement sont : l'ataxie, des convulsions débouchant sur une fibrillation musculaire et la paralysie, dermatite, œdème et diarrhée, vomissements, difficultés respiratoires qui peuvent provoquer la mort par asphyxie. Les doses mortelles chez l'homme après ingestion varient de 2 à 250 mg/kg. Des cas de réactions allergiques ont été décrits chez l'homme après contact avec la peau.

En administration chronique, la dose sans effet est obtenue avec une concentration de 12 mg/kg d'aliment sur une durée de deux ans chez la souris et de 2,1 mg/kg chez le rat. La dose sans effet chez le rat traité pendant 90 jours est de 10 mg/kg/j. Des cas de réaction cutanée ou d'irritation des muqueuses ont été décrits chez des ouvriers travaillant à la production de la molécule pendant une période de 7-8 ans, signes prévenus par le port de masques et de gants.

Les effets sur la reproduction chez le rat et la souris sont significatifs. En revanche, la deltaméthrine ne présente pas d'effet tératogène ni d'effet mutagène. Aucune information en ce qui concerne les effets cancérogènes n'est disponible.

Au niveau environnemental, la deltaméthrine disparaît dans le sol en 1-2 semaines et en une dizaine de jours sur la végétation. La deltaméthrine présente une forte toxicité pour les poissons. Cependant en conditions normales d'emploi, la faune aquatique (poissons, crustacés) n'est pas exposée.

- **Cyperméthrine** [12]

C'est un mélange de 8 isomères, chacun ayant ses propres caractéristiques chimiques et biologiques. Elle est modérément toxique par ingestion ou par contact cutané. A forte exposition cutanée, les symptômes vont de l'engourdissement, aux fourmillements, à des démangeaisons et sensations de brûlure, jusqu'à la disparition de coordination motrice, la paralysie voire la mort. Après empoisonnement par ingestion, les symptômes vont de la nausée aux vomissements, aux douleurs à l'estomac, à la diarrhée, aux convulsions et au coma. La cyperméthrine est légèrement irritante pour la peau et les yeux et pourrait causer des réactions d'allergie.

La DL<sub>50</sub> chez le rat est de 250 mg/kg quand elle est distribuée dans l'huile de maïs, mais de 4123 mg/kg quand elle est administrée dans l'eau. Elle est comprise entre 82 et 779 mg/kg chez la souris et dépend du rapport entre isomères *cis* et isomères *trans*.

Aucune donnée relative à la toxicité chronique n'est, semble-t-il, disponible. La cyperméthrine ne semble pas présenter d'effet sur la reproduction, ni d'effet tératogène ou mutagène. Ce produit serait un possible cancérigène bien que les tests ne soient pleinement concluants.

L'élimination du produit chez le rat est rapide (quelques heures) et son métabolisme très significatif (hydroxylation, hydrolyse). L'élimination des résidus stockés dans le tissu adipeux est plus lente.

La cyperméthrine est fortement toxique pour les poissons et les invertébrés aquatiques, mais les risques restent limités en conditions normales d'utilisation sur les cultures.

La persistance de la cyperméthrine dans les sols varie de quelques jours à plusieurs semaines en fonction du type de sol. Sur les végétaux, elle est limitée à quelques jours du fait d'une photodégradation significative.

- **Phénylpyrazoles (fipronil [13], imidaclopride [14])**

Ces deux substances agissent sur le système nerveux central des insectes. Le fipronil et l'imidaclopride ont une DL<sub>50</sub> de 97 et 450 mg/kg (administration orale), respectivement, et sont moins toxiques pour les mammifères que pour certains oiseaux et poissons et la plupart des insectes. En administration chronique, le fipronil est cancérigène chez le rat et la souris causant un cancer de la thyroïde [15,16]. L'imidaclopride ne semble pas posséder de propriétés mutagènes ou tératogènes.

- **Carbofuran**

C'est un carbamate ayant une activité d'inhibiteur de cholinestérases. Ce produit est considéré comme un probable perturbateur endocrinien. Il induit des altérations des spermatozoïdes et du système reproducteur mâle chez le rat [17,18] et le lapin [19]. Ce produit est aussi connu pour perturber le système thyroïdien chez la brebis, induisant une augmentation de la concentration en thyroxine dans le sang [20].

- **Chlorpyrifos [21,22]**

Ce composé est un produit de la famille des organophosphorés dont les propriétés insecticides ont été rapportées dès 1965. Des cas d'intoxication aiguë chez l'homme ont été décrits : le chlorpyrifos provoque une inhibition des cholinestérases plasmatiques qui servent de biomarqueurs d'exposition. Aucune étude n'a pu rapporter une quelconque incidence sur une augmentation de cas de cancers après exposition, ce qui est corroboré par les études effectuées sur animal ou celles conduites pour évaluer la génotoxicité. Des études de toxicologie de la reproduction montrent que ce produit pourrait être toxique pour le fœtus. Enfin, ce composé n'apparaît pas avoir de propriétés de perturbation endocrinienne qui le classerait dans le groupe des xénoœstrogènes, mais, en revanche, il perturbe chez la brebis le système thyroïdien en induisant une diminution de la concentration plasmatique de thyroxine [20].

## 2.2 LUTTE BIOLOGIQUE

### 2.2.1 Bactéries : *Bacillus thuringiensis*

Des préparations de bactéries sont utilisées en Amérique du Nord alors que de telles préparations ne sont pas homologuées sur la culture de maïs en France. Cette bactérie du sol produit une protoxine (cristaux protéiques) qui ingérée par les larves de pyrale ou de sésamie est transformée par les sucs digestifs en une toxine qui bloque le fonctionnement de l'appareil digestif.

Les toxines de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ne sont pas toxiques pour l'homme ou les animaux [23]. De très nombreuses toxines ont été identifiées parmi les différentes souches de *B. thuringiensis*. On connaît actuellement 40 familles de toxines de la famille des Cry, totalisant 251 toxines et 2 familles Cyt représentant 22 toxines.

Aucune toxicité n'a été trouvée chez le rat, la souris, les oiseaux, le chien ou le cobaye qui avaient reçu des cristaux de protéine Bt extraite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* par voie orale [66] en raison de l'absence de récepteurs à ces toxines dans les cellules épithéliales de l'intestin des mammifères, des oiseaux et des poissons. Bt est irritant pour les yeux et peut provoquer une légèr

irritation des voies respiratoires après inhalation. En administration chronique chez le rat par voie orale (8,4 g/kg/j) pendant 13 semaines, aucun effet toxique n'a été détecté. Les essais de toxicologie sur la reproduction, de tératogénicité, de mutagénicité et de cancérogénicité sont tous négatifs.

### **2.2.2 Insecte : *Trichogramma maidis***

Les lâchers de trichogrammes permettent de parasiter les œufs de pyrales présents sur les feuilles de maïs. Cette technique n'est pas très efficace en cas de forte infestation.

### **2.2.3 Champignon entomopathogène : *Beauveria bassania***

Ce moyen de lutte consiste à disséminer des spores d'un champignon du sol : *Beauveria bassania*, qui parasite les larves de pyrale.

### **2.2.4 Conclusion**

Ces trois voies de lutte biologique sont réputées respecter l'environnement. Cependant, leur efficacité n'est pas totale et dépend des conditions climatiques, de l'intensité de l'infestation, du stade d'intervention et du nombre de générations de l'insecte au cours de la culture. L'efficacité de l'intervention pour rester en deçà du seuil de nuisibilité est fortement conditionnée par une bonne connaissance de la biologie du parasite.

## **2.3 GENES BT**

L'insertion du gène Bt codant pour une protéine spécifique de telle ou telle famille d'insectes ravageurs confère à la plante ainsi modifiée des propriétés de résistance plus efficaces que celles apportées par lutte biologique ou lutte chimique effectuée en cas d'attaque importante. Ainsi divers maïs Bt sont résistants aux attaques de pyrales (*Ostrinia nubilalis*) et de sésamies (*Sesamia nonagrioides*) grâce aux gènes Cry1Ab, Cry1F ou Cry9C, et de chrysomèles des racines (*Diabrotica virgifera*) grâce aux gènes Cry3Bb1, Cry34Ab1 ou Cry35Ab1. Le cotonnier Bt est résistant aux attaques de noctuelles et du ver de la capsule (gène Cry1Ac) et la pomme de terre à celle de doryphores (gène Cry1Ab).

## **3 CULTURES DU MAÏS BT ET CONSEQUENCES AGRONOMIQUES**

### **3.1 EVOLUTION DES SURFACES CULTIVEES**

Une forte progression au niveau mondial des surfaces semées en maïs Bt est intervenue entre 2001 et 2002, qui passent de  $5,9 \times 10^6$  à  $7,6 \times 10^6$  ha [4,24]. Aux Etats-Unis, les surfaces emblavées en maïs Bt stagnent depuis 1998 à près de 22-25 % des surfaces totales semées [25]. Cette limite correspond à un compromis économique entre surcoût des semences et ampleur des pertes à la récolte provoquées par des attaques de pyrales maïs également à l'importance du débouché à l'exportation des maïs américains (2,5 Mt/an en Europe). Le plafonnement apparent constaté ces dernières années s'expliquerait aussi par une réduction des tailles de population de pyrales, argument important dans la décision des agriculteurs d'acheter ou non des semences de maïs Bt.

### **3.2 PRISE EN COMPTE DES PROBLEMES DE RESISTANCE**

Afin de réduire le plus possible l'apparition d'insectes résistants à certaines endotoxines modifiées et biosynthétisées dans le maïs Bt, des stratégies de zones refuges se sont mises en place. Elles consistent à cultiver des variétés conventionnelles pour favoriser le croisement des insectes possédant un allèle résistant, apparu sous forme récessive et hétérozygote, avec les homozygotes sensibles maintenus dans les zones refuges. Dans les régions exemptes de cultures de cotonnier telles que la Corn Belt, les zones refuges représentent 20 % des surfaces cultivées en maïs. Elles augmentent à 50 % là où coexistent des cultures de cotonniers et de maïs [25].

Dans ces zones refuges, l'utilisation d'insecticides, à l'exception de *Bacillus thuringiensis*, est possible. En pratique, que ce soit pour le maïs ou plus encore pour le coton, la disparition des traitements chimiques ne sera pas totale.

Aux USA, avec la mise en place de ces zones refuges, s'est développé un suivi de la résistance des populations de maïs Bt. L'EPA<sup>3</sup> utilise deux méthodes : l'application de doses discriminantes de toxines Cry1Ab et Cry1F et la comparaison des DL<sub>50</sub> d'une année sur l'autre ayant pour but de détecter l'apparition d'allèle de résistance.

A ce jour, aucun problème de résistance n'a été mis en évidence, y compris dans des régions des USA où des maïs Bt sont cultivés depuis 1996. De plus, aucun allèle de résistance n'a pu être sélectionné dans les différents laboratoires américains et européens travaillant cette question. Enfin, des estimations réalisées dans ces laboratoires [26,27] évaluent les fréquences des allèles de résistance dans les populations naturelles de pyrale à des valeurs inférieures à 10<sup>-3</sup>.

### **3.3 LUTTE CONTRE D'AUTRES RAVAGEURS EN MAÏSCULTURE**

De nouvelles variétés Bt résistantes aux attaques de chrysomèles des racines de maïs ont été expérimentées avec succès aux Etats Unis (efficacité de la protection contre les chrysomèles et sécurité chez l'Homme et chez les animaux -porcs, volailles et ruminants-). Elles ont été autorisées par la FDA<sup>4</sup> et devraient voir le jour en 2003 ce qui pourrait permettre une extension des surfaces semées en maïs Bt en Amérique du Nord. En effet, la chrysomèle provoque, en monoculture du maïs, plus de dégâts que la pyrale. De plus, la présence de chrysomèles en Europe a été détectée dès l'année 2000.

### **3.4 CONSEQUENCES SUR L'ENTOMOFAUNE DES VARIETES DE MAÏS BT**

En mai 1999, une note préliminaire paraît dans *Nature* suspectant que le pollen du maïs Bt peut être dangereux pour le papillon Monarque [28].

Ce résultat va mobiliser très rapidement un certain nombre de scientifiques concernés par cet éventuel problème et des expérimentations vont être conduites en réseaux avec différentes équipes durant deux années. Cela a conduit à la publication de 6 articles dans les PNAS (USA) réfutant l'hypothèse hâtive de l'article de *Nature*.

Il ressort clairement des travaux réalisés que le risque, pour les larves du papillon Monarque, d'être affectées par la consommation de pollen issu de maïs Bt soit sur des "milkweeds" (qui est leur habitat privilégié) soit même sur des feuilles de maïs est négligeable (cf. Annexe).

Il a été possible de conclure que l'utilisation de maïs Bt représente un environnement significativement plus sûr pour le papillon Monarque que l'utilisation d'insecticides chimiques.

## **4 GENE BT ET NIVEAUX DE CONTAMINATION EN MYCOTOXINES CHEZ LE MAÏS-GRAIN**

La présence, à des degrés variables, de diverses mycotoxines dans le maïs-grain est documentée de longue date. L'observation de teneurs significativement moindres en mycotoxines dans le grain des maïs génétiquement modifiés avec le gène Bt a constitué un argument opportunément exploité par les professionnels du secteur PGM dans une stratégie de développement de leurs activités, d'une part, et dans une démarche générique visant la restauration de l'image des produits issus de PGM et la promotion de l'acceptabilité sociétale de ces derniers. Cependant, il s'agit d'un bénéfice allégué dans un contexte spécifique, qui n'avait pas été stratégiquement anticipé dans le principe du développement des PGM Bt, et qui demeure, *de facto*, un effet opportun non-intentionnel qu'il

---

<sup>3</sup> EPA : Environmental Protection Agency (USA)

<sup>4</sup> FDA : Food and Drug Administration (USA)

convient de mesurer à l'aune d'évaluations rigoureuses pour en apprécier la portée véritable et le bénéfice pour la santé animale et humaine.

#### 4.1 MYCOTOXINES DU MAÏS : ORGANISMES SOURCES, CONTAMINATION ET DIVERSITE DES TOXINES.

Le maïs-grain, principalement, et à un moindre degré, la plante entière sont usuellement contaminés par des champignons microscopiques (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*...), moisissures qui appartiennent à la flore champêtre et à la flore de stockage. Ils s'introduisent parfois au niveau de l'épi puis se développent dans la rafle au cours de la végétation (pathogènes végétaux) et même après la récolte si les conditions leur sont favorables (espèces saprophytes).

Les mycotoxines constituent des métabolites secondaires de ces différentes espèces de micromycètes. A ce titre, elles ne sont pas indispensables à la croissance du champignon et sont produites en réponse à des stimuli extérieurs en relation avec les conditions climatiques et environnementales ainsi que la réponse de la plante à l'agression [29]. Plusieurs paramètres sont associés, de surcroît, au degré de contamination des plantes et céréales : les modes et conditions de récolte et de conservation (pH, aérobose, température, humidité), le tri et le dépoussiérage éventuels du grain de maïs avant utilisation [30], les lésions infligées à la plante ou au tégument du grain par différentes espèces de ravageurs qui constituent une porte d'entrée du champignon [31,32].

*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* concourent à la production de six familles de mycotoxines constituant, par le biais des denrées agricoles, un danger pour la santé publique. Le genre *Aspergillus* produit des aflatoxines, et en commun avec le genre *Penicillium*, il synthétise également l'ochratoxine et la patuline. Les espèces du genre *Fusarium* sont productrices de fumonisines, de trichothécènes et de zéaralénone [33,34]. Selon leur nature exacte, ces mycotoxines exercent chez l'homme, l'animal d'élevage et les animaux modèles de laboratoire des effets biologiques cancérigènes, mutagènes, tératogènes, œstrogénomimétiques, neurotoxiques et immunotoxiques. Les mycotoxines décrites chez le maïs sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, le déoxynivalénol, la zéaralénone ainsi que d'autres trichothécènes, des fumonisines et la moniliformine [35]. Puisque le maïs constitue un hôte relativement spécifique d'*Aspergillus flavus*, il recèle des aflatoxines du groupe B et non celles du groupe G qui sont produites par d'autres espèces d'*Aspergillus*.

#### 4.2 EFFETS PATHOLOGIQUES, DANGEROUSITE, SYNERGIE D'EFFETS ET DETOXICATION

Les conséquences de l'exposition à chacune de ces mycotoxines sont principalement connues au travers des premières descriptions des manifestations pathognomoniques rapportées dans des cas avérés d'intoxication aiguë.

- Les **aflatoxines**, originellement identifiées lors d'un épisode d'hépatotoxicité mortelle dans des élevages de dinde en Grande Bretagne, il y a près de quarante ans, ont également donné lieu à des intoxications alimentaires létales humaines comme celle ayant causé la mort de treize enfants en Malaisie en 1988 [36]. L'exposition chronique aux aflatoxines représente un risque considérable car il est établi qu'elles sont cancérigènes et elles sont classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer<sup>5</sup> (CIRC/IARC), groupe 1 (cancérigène chez l'homme) sauf l'aflatoxine M1, métabolite d'origine animale trouvé dans le lait et qui appartient au groupe 2B (potentiellement cancérigène chez l'homme).
- Bien que possiblement produite avant la récolte, l'**ochratoxine A** est plus communément générée durant les étapes de stockage du grain. Les souches de *Penicillium* productrices ont un tropisme plus particulier pour les régions tempérées ou froides alors que les souches d'*Aspergillus* productrices sont observées dans des climats chauds et humides. Classée en 1993 comme cancérigène humain possible par CIRC, l'ochratoxine A est, en raison de sa néphrotoxicité, un facteur de causalité de la prévalence élevée de la "néphropathie endémique des Balkans" et de cancers de l'appareil urinaire en Europe centrale (classée groupe 2B).
- Les **trichothécènes** constituent un groupe vaste de molécules à forte homogénéité structurale (plus de 150 molécules décrites). Produits par de nombreuses espèces de *Fusarium* qui se

<sup>5</sup> <http://monographs.iarc.fr>

développent sur la plante en période assez froide, trois toxines sont plus particulièrement surveillées : le **nivalénol** (groupe 3 [non classable au regard de son pouvoir cancérigène chez l'homme]), le **désoxynivalénol** ou "vomitoxine" (classé groupe 3) et la **toxine T-2** (groupe 3). Une étude exhaustive de 1988 indique clairement que les pays de l'hémisphère Nord sont particulièrement affectés [37] comme le confirme une revue de la littérature [34]. Durant les épisodes d'intoxication aiguë, on observe principalement une symptomatologie gastro-intestinale (vomissements).

- La **zéaralénone** (classée groupe 3), qui résulte de l'infestation de la plante par diverses espèces du genre *Fusarium*, exerce une toxicité chronique qui se manifeste par des effets œstrogénomimétiques chez les animaux femelles observés dans les élevages de porcs et de moutons et se traduisant par des épisodes d'infertilité [38].
- Les **fumonisines** sont caractérisées depuis seulement une quinzaine d'années et elles retiennent particulièrement l'attention pour différentes raisons. Les trois molécules représentatives de cette famille [B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>] exercent une variété d'effets pathologiques dans une diversité d'espèces animales : la leucoencéphalomalacie du cheval, l'œdème pulmonaire chez le porc et la carcinogenèse hépatique chez le rat [39]. Classée par le CIRC comme cancérigène possible chez l'homme, la fumonisine B<sub>1</sub> (groupe 2B en 2002) est la forme prédominante lors d'une contamination. L'association statistique de sa présence dans les denrées à des taux substantiels et l'observation de l'accroissement des cas de cancer de l'œsophage a été établie en Afrique du Sud [40] et est très fortement suspectée en Italie [41,42]. Dans ce dernier cas, c'est la farine de maïs utilisée dans la préparation de la polenta qui constituerait le support de l'intoxication humaine [41]. Au plan moléculaire, les fumonisines interfèrent avec le contrôle de la biosynthèse des sphingolipides. Concernant les toxines du genre *Fusarium*, c'est plus particulièrement au site de culture que siège le risque de contamination mycotoxinique.

Les molécules que nous avons évoquées présentent la particularité d'être fréquemment observées en association, à des concentrations variables, dans les grains de maïs et leurs produits dérivés. Il résulte de cette co-exposition/intoxication alimentaire des effets toxiques synergiques lorsqu'on les compare aux effets intrinsèques des diverses molécules considérées individuellement. L'effet de synergie s'étend, de surcroît, à des risques biologiques. Ainsi, en Chine, la superposition des zones géographiques de prévalence de l'exposition aux aflatoxines et d'endémie de l'hépatite B révèle un risque accru d'incidence du cancer primitif du foie. Une exposition modérée à l'aflatoxine B<sub>1</sub> triple le risque de survenue d'un hépatocarcinome chez les porteurs chroniques du virus B [43].

Les voies métaboliques de détoxification qui concernent ces molécules impliquent des enzymes usuelles hépatiques et entérocytaires de fonctionnalisation (cytochromes P450) et de conjugaison. Cependant, des cas d'activation moléculaire malencontreuse, par ces mêmes enzymes, ont été rapportés concernant les métabolites secondaires de moisissures susceptibles de contaminer le maïs.

#### **4.3 DONNEES NORMATIVES ET REGLEMENTAIRES, INFLUENCE DU CLIMAT ET DES PRATIQUES CULTURALES**

Concernant les **aflatoxines**, à partir du 12 décembre 2003, les dispositions du règlement 2174/2003 qui modifie le règlement 194/97 et 466/2001 s'appliquent. La teneur maximale admise pour les maïs destinés directement à la consommation humaine ou comme ingrédient de denrées alimentaires est celle des céréales en général : 2 µg/kg pour l'aflatoxine B<sub>1</sub> et 4 µg/kg pour le total des aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>.

Concernant l'alimentation animale, la directive 2002/32/CE du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux fixe à 20 µg/kg la teneur maximale en aflatoxine B<sub>1</sub> du maïs (12% humidité) dans la matière première, à des teneurs comprises entre 5 µg/kg et 50 µg/kg dans l'aliment complet ou complémentaire et selon l'espèce animale à laquelle est destiné cet aliment.

Concernant l'**ochratoxine A**, à partir du 5 avril 2002, les dispositions du règlement 472/2002 qui modifie le règlement 466/2001 s'appliquent. Les limites maximales en ochratoxine A sont respectivement de 5 µg/kg pour les grains de céréales brutes et de 3 µg/kg pour les produits dérivés de céréales ainsi que les grains destinés à la consommation humaine directe.

Concernant les **fusariotoxines**, en absence de disposition réglementant leurs teneurs dans les produits alimentaires, les recommandations du Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France (CSHPF) constituent des références en matière d'option de gestion du risque (avis du 8/12/1998). La recommandation du CSHPF propose de ramener de 200 à 50 µg/kg la teneur maximale des céréales et produits dérivés en **zéaralénone** et à 3000 µg/kg leur teneur en **fumonisine B<sub>1</sub>** (valeur à cibler 1000 µg/kg).

Des discussions sont actuellement en cours à la Commission européenne pour fixer les teneurs maximales en **zéaralénone, désoxynivalénol et fumonisines**.

L'ensemble des recommandations du CSHPF évoquées prend en considération la faisabilité du projet au regard des moyennes mesurées des concentrations en mycotoxines des céréales produites en France. Un commentaire particulier doit être fait au regard du risque inhérent aux aflatoxines. Les conditions climatiques de la France sont défavorables aux organismes qui les synthétisent. S'agissant d'une production de toxines étroitement associée à de mauvaises conditions de stockage, les pratiques professionnelles des filières céréalières françaises sont défavorables au développement des *Aspergillus*. L'abandon de la pratique du séchage des épis entiers en cribs l'illustre. Il est établi que la contamination par l'aflatoxine peut être très efficacement prévenue par le séchage artificiel dès la récolte [44]. De façon concordante, les données disponibles indiquent que les cas de dépassement de limite en aflatoxines sont très rares concernant la production française de maïs (moyenne de distribution des lots non contaminés de céréales françaises : 0,6 µg/kg [45]). Cet ensemble de faits concordants suggère que dans le contexte spécifique à la France le risque, pour la santé publique, associé à l'exposition aux aflatoxines par l'intermédiaire de consommation de maïs cultivé en France, présente les signes patents d'une maîtrise satisfaisante au regard des normes en vigueur.

En revanche, les fusariotoxines sont issues d'organismes mieux adaptés au climat tempéré français. Elles sont produites dans le cadre de la culture de la plante et préexistent dans le produit entreposé. Leur incidence dans le maïs, ses dérivés pour alimentation animale ou humaine, est élevée et les valeurs maximales mesurées dans certains lots contaminés peuvent être considérables. Dans le contexte de la France, on perçoit la difficulté de maîtrise de la contamination du maïs par les fusariotoxines. Leurs concentrations représenteraient donc des paramètres particulièrement pertinents dans l'appréciation d'un bénéfice allégué qu'apporterait la culture d'un maïs Bt en comparaison des cultures conventionnelles.

#### 4.4 SUREXPRESSON DE LA TOXINE Bt ET INCIDENCE SUR LA CONTAMINATION EN MYCOTOXINES DU MAÏS

La fréquence et la sévérité des contaminations fongiques du maïs dépendent de paramètres multiples. Outre l'influence météorologique locale, il est établi par un nombre substantiel de publications que le degré d'imprégnation en mycotoxines du grain est corrélé à la sévérité des agressions causées à la plante par les insectes ravageurs [46,47,48]. En conséquence, il y a une attente légitime d'observer, chez une plante devenue moins sensible aux prédateurs d'insectes, un impact mesurable sur l'intensité de la contamination fongique et/ou celle de l'imprégnation en mycotoxines. Cependant, la rationalité de cette relation de cause à effet ainsi que les bénéfices escomptés n'ont pas été revendiqués aux étapes initiales du développement des PGM par les différents groupes semenciers. Nous observons qu'aujourd'hui les résultats d'études permettant d'authentifier la moindre imprégnation des PGM en mycotoxines sont abondamment utilisés auprès des professionnels pour la promotion des produits PGM et de leur image. Une étude de G. Brooks a évalué l'impact de la culture des maïs Bt sur les exploitations en Espagne [49] ; on y relève que les exploitants espagnols ont une perception qualitative supérieure du maïs Bt sur la base des moindres quantités de mycotoxines (fumonisines) qu'il recèle. Le document de référence cité est l'étude de Bakan *et al.* publiée en 2002 [32] mettant en œuvre des études de terrain en France et en Espagne. Ce fait illustre l'exploitation rapide des données scientifiques à des fins de communication, voire de promotion commerciale. Dans ce contexte, il est utile de porter une appréciation distanciée et objective sur les résultats du nombre encore limité des études traitant spécifiquement du sujet chez le maïs.

Le tableau 1 présente une synthèse des facteurs d'augmentation (plus) ou de diminution (moins) des teneurs comparées en diverses mycotoxines mesurées dans des **maïs Bt** par rapport à celles mesurées dans des **maïs conventionnels** dits isogéniques.

**Tableau 1.** Variations des contaminations en mycotoxines dans les grains de maïs Bt établies par différents auteurs

Etudes	Mycotoxines			
	Désoxynivalénol	Aflatoxines	Zéaralénone	Fumonisine B1
Brake et Vlachos, 1998 [50]	moins 30 fois	moins 0,5 fois		<1ppm dans les 2 échantillons
Munkvold et Hellmich, 1999 [51]				moins 0,25 à moins 9 fois en 1995, 96 et 97
Dowd 2000 [52] MON 810 BT 11 GC 592				moins 30 à moins 40 fois en 1997 et 98 NS en 1995/98
Pietri et Piva, 2001 [53]	NS	NS	NS	moins 6 à moins 10 fois en 1997, 98 et 99
Aulrich <i>et al</i> 2001 [54]	moins 0,7 à moins 10 fois			0 à moins 20 fois
Masoero <i>et al</i> 1999 [65]	moins 0,5 fois	moins 2 fois		moins 10 fois
Dowd 2001 [55]				fumonisines moins 1,8 à moins 15 fois
Bakan <i>et al</i> 2002 [32]	plus 1,5 à moins 13 fois		moins 8 fois (sur 1 essai sur 5)	moins 5 à moins 28 fois

NS : pas de variation significative.

Il convient de décrire le contexte de certaines études pour en évaluer la portée avec plus d'acuité. Ainsi, le travail de Brake et Vlachos [50] constitue une étude d'alimentarité comparée chez le poulet. L'évaluation des teneurs en désoxynivalénol et aflatoxines était une analyse ponctuelle de deux lots de maïs Bt (événement Bt 176) et conventionnel.

L'étude de Munkvold et Hellmich [51] présente les particularités remarquables d'avoir été conduite durant trois années consécutives 1995, 1996 et 1997 (conditions climatiques différentes) et d'avoir comparé des essais de terrain comportant des infestations par *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) soit naturelles, soit contrôlées en utilisant des larves juvéniles et en reproduisant des degrés d'infestation comparables aux infestations naturelles. Les événements transgéniques affectant les hybrides considérés dans l'étude étaient multiples (ex : MON 810, Bt 11, Bt 176, etc.) et consistaient tous en l'expression contrôlée de gènes *cry* de *B. thuringiensis*. Pour chacune des trois années d'expérimentation, les maïs conventionnels excédèrent l'une au moins des limites recommandées par l' "American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians" pour l'alimentation du cheval (5 mg/kg fumonisines) ou du porc (10 mg/kg fumonisines). En 1996 et 1997 la teneur totale en fumonisines (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + B<sub>3</sub>) des maïs transgéniques correspondants furent respectivement 4,1 et 7,9 fois moindres. Reproduisant des résultats antérieurs, une corrélation entre la sévérité de la prédation du ravageur, la présence de *Fusarium* dans la plante et la teneur en fumonisines a été établie. Une interprétation statistique poussée des résultats a tenté d'apprécier, pour leur compte propre, l'influence de l'origine des différents hybrides et la nature de l'événement transgénique considéré.

Les travaux de Pietri et Piva [53] portant sur l'événement MON 810 ont été conduits sur trois années, 1997, 1998, 1999 sur un total de 37 sites représentant un total de 93 échantillons. Les auteurs rapportent que la différence la plus marquée relative à la moindre teneur en fumonisine B<sub>1</sub> des maïs transgéniques (moins 10 fois), correspond à l'année la plus humide durant la période de croissance de la plante offrant les meilleures conditions de croissance des moisissures.

L'étude de Bakan *et al.* [32] a été conduite avec l'événement transgénique MON 810 (*cry1A(b)*). Cinq essais de terrain (1999) ont été analysés (trois en France, deux en Espagne) dans des zones de prévalence d'*Ostrinia nubilalis* et de *Sesamia nonagrioides* (pink stem borer). L'évaluation indirecte du degré de contamination fongique par appréciation du contenu de la plante en ergostérol confirme la corrélation entre contamination par les micromycètes et contenu en mycotoxine. La présence de



micromycètes dans les maïs transgéniques a été, selon les sites expérimentaux de 4 à 18 fois moindre que celle des maïs conventionnels isogéniques (fumonisine B<sub>1</sub> : 5 à 28 fois moins). On observera que les teneurs en fumonisine B<sub>1</sub> des maïs conventionnels français ont été singulièrement élevées par rapport aux moyennes usuellement mesurées. Ces valeurs contrastées ont mis en exergue le potentiel bénéfique offert par le maïs transgénique dans des conditions spécialement favorables au développement fongique. Cette étude a également mesuré les teneurs d'autres fusariotoxines, trichothécènes (désoxynivalénol, nivalénol) et zéaralénone. Il serait délicat d'interpréter ces résultats car d'aucuns sont contradictoires entre sites expérimentaux pour une molécule particulière (désoxynivalénol) et d'autres ont des valeurs proches des seuils de détection des méthodes utilisées, n'offrant qu'un nombre restreint de différences statistiquement significatives entre lots conventionnel et transgénique (nivalénol et zéaralénol). Il peut sembler incohérent d'avoir un effet marqué de moindre teneur en fumonisine dans les maïs transgéniques alors que l'effet n'est pas observé de manière convaincante pour d'autres toxines produites par le même parasite. Ce point n'est pas explicitement discuté dans l'article et il serait légitime de penser que la précision analytique atteinte, au regard des faibles teneurs dans les produits, peut encore constituer un verrou technologique dont il faudrait s'affranchir pour accéder à une interprétation comparable des résultats concernant les concentrations en trichothécènes et zéaralénone.

#### **4.5 QUALITE DES PRODUITS ANIMAUX**

##### **4.5.1 Incidence du gène Bt sur la contamination du maïs par les mycotoxines.**

Les conditions d'humidité lors de la récolte ou au cours du stockage peuvent, dans certains cas, être favorables au développement de champignons microscopiques (*Aspergillus*, *Fusarium*...). Cette situation a été particulièrement bien décrite lors des longs séchages en cribs de l'épi entier ; la contamination par l'aflatoxine peut alors être redoutable, mais peut être très efficacement prévenue par le séchage artificiel dès la récolte [44].

Plus récemment, c'est surtout une contamination par les fumonisines dont le développement à partir de *Fusarium* est favorisé par les lésions occasionnées aux spathes par les dégâts de la larve de la pyrale [50,51]. Cette contamination très significativement augmentée dans le maïs normal, mais très dépendante des conditions climatiques et de l'intensité des dégâts de la pyrale, a été décrite à la fois en Amérique du Nord [51,56] et dans tous les pays de l'Europe producteurs de maïs-grain comme la France, l'Italie, l'Espagne [57] (tableau 1).

La contamination toujours modérée de la plante entière de maïs Bt est, elle aussi, moins élevée que celle du maïs conventionnel, d'autant que le développement de champignons au cours de la conservation par ensilage est également à redouter pour ce dernier [56].

Bien que l'on n'ait pas formellement déterminé le niveau de toxicité de la fumonisine chez les animaux domestiques, on sait qu'elle entraîne la leucoencéphalomalacie chez le cheval, l'œdème pulmonaire chez le porc, qu'elle est cancérogène chez les rongeurs, et qu'elle entraîne le cancer de l'œsophage chez l'homme (SCAN<sup>6</sup>, 2003, communication personnelle). Elle serait associée à une diminution relative des performances de croissance du poulet alimenté à partir de maïs témoin contaminé en fumonisine [58].

##### **4.5.2 Qualité nutritionnelle et sécurité alimentaire du maïs, du coton et du soja Bt**

Les données sur l'équivalence en substance des plantes génétiquement modifiées actuellement en culture dans certains pays n'est plus à décrire : c'est toujours l'une des conditions d'acceptation des nouvelles variétés végétales.

Les références de travaux sont nombreuses dans le cas des maïs Bt et les résultats confirmés statistiquement [59]. De nombreuses études préalables à l'autorisation de dissémination des OGM ont été effectuées plus spécifiquement sur les animaux de ferme plutôt que sur les animaux de laboratoire. Ainsi, on a dénombré dans la littérature scientifique les résultats de 19 publications

---

<sup>6</sup> SCAN : Scientific Committee on Animal Nutrition (européen)

dédiées au test de la sécurité alimentaire des plantes porteuses d'un gène Bt dont seize sur le maïs, deux sur le coton et une sur le soja :

- 3 sur le maïs plante entière chez les bovins à l'engrais d'une durée maximum de 246 jours ;
- 3 sur le maïs plante entière chez la vache laitière d'une durée de 91 jours au maximum ;
- 5 sur le maïs grain chez le porc à l'engrais d'une durée maximum de 90 jours ;
- 5 sur le maïs grain chez le poulet d'une durée maximum de 42 jours ;
- 2 sur le coton (tourteau) distribué à la vache laitière ;
- 1 sur le soja (tourteau) distribué au poulet.

Les expérimentations les plus nombreuses sur maïs Bt portent à la fois sur le grain utilisé chez tous les animaux et sur la plante entière réservée aux ruminants.

Les performances quantitatives exprimées par les paramètres zootechniques sont complétées par des mesures de la qualité des produits : composition du lait, composition et qualité des carcasses des bovins, des porcs et des poulets, ainsi que du poids des morceaux de découpe. Elles sont parfois aussi renseignées par les propriétés organoleptiques des viandes. Aucun de ces paramètres n'a été modifié par l'ingestion de maïs, de coton ou de soja Bt acceptés pour la culture et la consommation animale par les autorités officielles (FDA<sup>7</sup> et EPA<sup>8</sup> pour les USA, SCP<sup>9</sup>/SCAN pour l'Union européenne).

Si, pour la quasi-totalité de ces études, l'absence de différence observée pour les performances et l'état général des animaux de ferme consommant des plantes porteuses du gène Bt a permis de conclure que ni la construction génétique (ADN) ni la (les) protéine (s) exprimée (s) ne sont toxiques pour les animaux, et partant, pour l'homme, la meilleure qualité nutritionnelle liée à une moindre contamination probable en mycotoxines se traduisant par des performances de croissance supérieures des animaux consommant le maïs Bt reste à démontrer. Deux études réalisées chez le poulet et le porc en croissance par Piva *et al* [58,60] semblent indiquer un lien entre une moindre contamination en fumonisine B<sub>1</sub> et des performances de croissance supérieures. Des études plus approfondies sur la nature et la quantité de résidus en mycotoxines dans les produits d'origine animale devront être réalisées afin d'évaluer le bénéfice possible pour la santé du consommateur liée à une moindre contamination de produits d'origine provenant d'animaux (ruminants, porcs ou volailles)<sup>10</sup> dont l'alimentation repose essentiellement sur un aliment à base de maïs Bt.

## 5 CONCLUSIONS

L'introduction de nouvelles variétés résistantes aux attaques d'insectes permet de diminuer considérablement la quantité de traitements insecticides et, dans les mêmes proportions, celle de matière active en particulier sur la culture de coton. Cependant des variations géographiques existent. En effet, eu égard à l'ensemble des produits phytosanitaires utilisés dans les principales cultures aux USA, des estimations pour l'année 2001 sur le marché intérieur américain avancent le chiffre de près de 2000 tonnes de matières actives de réduction de consommation liée à l'utilisation de variétés Bt pour le maïs et le coton, ce qui ne constituerait que 10% de la réduction des tonnages en produits phytosanitaires, l'essentiel de cette « économie » étant lié à l'introduction de variétés de soja, maïs et coton tolérantes aux herbicides [61].

Dans les pays en développement, l'introduction de coton Bt a des répercussions sur la "santé" de l'environnement avec une moindre contamination par les produits insecticides, sur la santé des manipulateurs qui ne sont pas toujours bien formés aux risques chimiques qu'ils encourent en utilisant ces matières actives sans nécessairement appliquer toutes les précautions requises, sur l'économie de l'exploitation en libérant une main d'œuvre, sur la qualité des sous-produits utilisés comme complément alimentaire en élevage villageois tels que la graine de coton qui sera vraisemblablement moins contaminée par les résidus d'insecticides.

<sup>7</sup> FDA : Food and Drug Administration (USA)

<sup>8</sup> EPA : Environmental Protection Agency (USA)

<sup>9</sup> SCP : Scientific Committee on Plants (européen)

<sup>10</sup> Une étude est actuellement en cours à l'Afssa qui vise à évaluer l'exposition des animaux aux mycotoxines et leur impact sur les performances zootechniques de ces animaux.

En revanche, l'introduction du maïs Bt est largement conditionnée par un raisonnement économique. Comme peu de traitements insecticides sont à l'heure actuelle utilisés du fait de leur coût important à partir d'un certain stade végétatif et de leur efficacité très partielle, ces variétés ne sont utilisées que si les dégâts occasionnés par les insectes tels que pyrales, sésamies et chrysomèles risquent d'être trop importants, et, par conséquent, pénalisants sur le plan économique. Dans certains cas, une meilleure maîtrise des façons culturales permet déjà, sans recourir aux variétés Bt, de limiter très sensiblement les dégâts aux cultures.

L'introduction des variétés Bt, que ce soit pour le cotonnier ou le maïs, ne pourra couvrir la totalité des surfaces de façon à contrôler l'apparition possible de résistances chez les insectes concernés. Dès lors, pour la culture de coton essentiellement, cohabiteront deux modes de limitation des populations d'insectes ravageurs, l'un génétique avec l'intérêt souligné plus haut sur le plan de la santé, l'autre chimique avec les risques toxiques déjà mentionnés.

De façon non intentionnelle au plan stratégique, l'introduction de variétés de maïs Bt permet de diminuer dans de nombreuses situations la contamination en mycotoxines consécutive aux attaques d'insectes sur la plante et le grain de maïs. Les résultats des études disponibles sont incontestables et marqués en ce qui concerne les fumonisines produites par des moisissures qui sévissent dans les climats des pays d'Europe. Les résultats relatifs aux trichothécènes et à la zéaralénone sont encore en nombre trop limité pour aboutir à une conclusion aussi nette que celle concernant les fumonisines. Cependant, les observations, à une exception près, font effectivement ressortir une baisse des teneurs de ces mycotoxines dans les maïs Bt, ce qui est cohérent avec les résultats relatifs aux fumonisines. Ceci devrait avoir une incidence, difficile à mesurer pour l'instant, sur la santé des animaux d'élevage auxquels est destinée en priorité la production de maïs-grain et, donc, sur la qualité des produits animaux consommés par l'homme. Dans leur étude, Piva *et al* [58,60] ont déjà observé une meilleure croissance chez le porc et le poulet nourris par du maïs Bt qui était moins contaminé en fumonisine B<sub>1</sub> que du maïs conventionnel isogénique, cette meilleure qualité ayant vraisemblablement une incidence sur bon nombre de paramètres du métabolisme général. Ce constat pourrait encourager la création de nouvelles variétés résistantes au développement de champignons par sélection classique [62,46] ou par l'introduction de gènes codant des protéines ayant une activité antifongique [63] ou étant impliquées dans la biosynthèse de composés antifongiques [64].

Bien qu'elle fût détectée et confirmée *a posteriori*, la moindre présence de mycotoxines dans les maïs Bt, sous les climats tempérés européens, est à porter au crédit d'une stratégie d'intervention génétique sur le maïs qui ne la visait pas, ni ne l'avait anticipée. Ce résultat, étayé par un nombre substantiel d'études de qualité, doit désormais être évalué au regard des bénéfices effectifs que le consommateur peut espérer pour sa santé. Ils sont de deux ordres : l'un, direct, par la consommation humaine de produits dérivés du maïs, le second, indirect, au travers de la qualité des produits d'origine animale issus d'une alimentation à base de maïs. Indubitablement, ce fait constitue un point positif dont il serait possible de tirer profit pour accroître la qualité sanitaire des alimentations humaine et animale.

## Références bibliographiques

- 1 Nepl C.C. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. BA Thesis. Environmental studies. University of Chicago. May 26, 2000.
- 2 Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J & Dean DH. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.
- 3 Liu Y.B., Tabashnik B.E. (1997) Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264, 605-610.
- 4 Clive J. (2003) Global status of commercialized transgenic crops: 2002. *ISAAA Briefs* 27.
- 5 Beuve M., Naïbo B., Foulgocq L., Courbon R., Lapierre H. (2000) La jaunisse nanisante de l'orge chez le maïs-grain. *Phytoma*, 525, 35-37.
- 6 Phipps R.H., Park J.R. (2002) Environmental benefits of genetically modified crops: global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *J. Anim. Sci. Feed Sci.* 11, 1-18.
- 7 Huang J., Hu R., Pray C., Quiao F. (2001) Rozelle S. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. 5<sup>th</sup> *Internat. Consortium Ag. Biotech. Res.*, Ravello, Italie, 15-18 juin 2001, pp 109-110 (résumé).
- 8 Carpenter J.E. (2001) Case studies in benefits and risks of Agricultural Biotechnology: Roundup Ready soybeans and Bt field corn. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington DC.
- 9 Edge J.M., Benedict J.H., Carroll J.P., Reding H.K. (2001) Bollgard cotton: an assessment of global, economic, environmental and social benefits. *J. Cotton Sci.* 5, 1-8.
- 10 Pyrethrins and pyrethroids. National Pesticide Telecommunications Network (NPTN), 1998. <http://ace.orst.edu/info/nptn> ou <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/>.
- 11 Deltamethrin. EXTOKNET PIP (Extension Toxicological Network – Pesticide Information Profiles). Oregon State University (1995). <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips/deltamet.htm>.
- 12 Cypermethrin. EXTOKNET PIP (Extension Toxicological Network – Pesticide Information Profiles). Oregon State University (1995). <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips/cypermet.htm>.
- 13 <http://www.pan-uk.org:80/pestnews/actives/fipronil.htm>
- 14 <http://www.bcpbookshop.co.uk/acatalog/downloads/samplepest.rtf>
- 15 New Pesticide Fact Sheet, 1996, US EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington DC, 20460, EPA-737-F-96-005. <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199...ay-12/pr-736DIR/Facts/Factsheet.txt.html>
- 16 Hurley PM, Hill RN & Whiting RJ. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Persp.* 106 (1998) 437-445.
- 17 Pant N., Prasad A.K., Srivastava S.C., Shankar R., Srivastava S.P. (1995) Effect of oral administration of carbofuran on male reproductive system of rat. *Human & Experiment. Toxicol.* 14, 889-894.
- 18 Pant N., Shankar R., Srivastava S.P. (1997) *In utero* and lactational exposure of carbofuran to rats: effect on testes and sperm. *Human & Experiment. Toxicol.* 16, 267-272.
- 19 Yousef M.I., Salem M.H., Ibrahim H.Z., Helmi S., Seehy M.A., Bertheussen K. (1995) Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environmental Sci. Health* B30, 513-534.
- 20 Rawlings N.C., Cook S.J., Waldbillig D. (1998) Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *J. Environmental Sci. Health* 54, 21-36.
- 21 Gandhi R., Snedeker S.M. (1999) Critical evaluation of chlorpyrifos breast cancer risk. Program on breast cancer and environmental risk factors in New York state (BERCF). Critical evaluation n°9, 1999, Cornell University. <http://www.cfe.cornell.edu/bcerf/>.

- 22 ATSDR. Toxicological profile for chlorpyrifos. NTIS, 1997, PB98-103088 (Atlanta: Agency of Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service).
- 23 *Bacillus thuringiensis*. EXTTOXNET PIP (Extension Toxicological Network – Pesticide Information Profiles). Oregon State University (1996). <http://ace.ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/bacillus.htm>.
- 24 Clive J. (2001). Global review of commercialized transgenic crops: 2001. *ISAAA Briefs* 24.
- 25 Bourguet D., Desquilbet M., Lemarié S. (2002) Gestion des maïs *Bt* aux Etats-Unis. Mise en place des zones refuges. Inra, Compte rendu de mission.
- 26 US Environmental Protection Agency (1998). The Environmental Protection Agency's white paper on Bt Plant-pesticide resistance management, may. [www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/white\\_bt.pdf](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/white_bt.pdf).
- 27 US Environmental Protection Agency (2001). Biopesticides registration action document (BRAD), october. [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/reds/brad\\_bt\\_pip2.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/reds/brad_bt_pip2.htm).
- 28 Losey J.E., Rayor L.S., Carter M.E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399, 214.
- 29 Yiannikouris A., Jouany J-P. (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals. *Anim. Res.* 51, 81-89.
- 30 Scudamore K.A., Patel S. (1999) Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisines in maize into the United Kingdom. *Anim. Feed Sc. Technol.* 78, 21-37.
- 31 Le Bars J. Contamination fongique et mycotoxique d'aliments composés fabriqués à la Guadeloupe. *Sci. Alim.* 2 (1982) 61-66.
- 32 Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B. (2002) Fungal growth and *fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J. Agric. Food Chem.* 50, 728-731.
- 33 Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sc. Technol.* 78, 21-37.
- 34 Pittet A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Rev. Med. Vet.* 149, 479-492.
- 35 Scudamore K.A., Patel S. (2000) Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisines in maize into the United Kingdom. *Food Addit. Contam.* 17, 407-416.
- 36 Chao T.C., Maxwell S.M., Wong S.Y. (1991) An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in Malaysia: a clinicopathological study. *J Pathol.* 164, 225-33.
- 37 Tanaka T., Hasegawa A., Yamamoto S., Lee U.S., Sugiura Y. Ueno Y. (1988) Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36, 979-983.
- 38 Kuiper-Goodman T. Scott P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 3; 179-248.
- 39 Dutton M.F. (1996) Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther.* 70, 137-61.
- 40 Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel .P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., van Schalkwyk D.J. (1992) *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82, 353-357.
- 41 Doko M.B., Visconti A. (1994) Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Addit. Contam.* 11, 433-439.
- 42 Franceschi S., Bidoli E., Baron A.E., La Vecchia C. (1990) Maize and risk of cancers in the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. *J Natl. Cancer Inst.* 17, 1407-1411.
- 43 Ming L., Thorgeirsson S.S., Gail M.H., Lu P., Harris C.C., Wang N., Shao Y., Wu Z., Liu G., Wang X., Sun Z. (2002). Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 36, 1046-1049.
- 44 Shotwell O.L., Hesseltine C.W., Goulden M.L., Vandegraft E.E. (1973) *Cereal Sci. Today* 16 266-273.

- 45 Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. CSHPF, TEC & DOC Eds, Paris 1999.
- 46 Munkvold G.P., Desjardins A.E. (1997) Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81, 556-565.
- 47 Dowd P.F. (1995) Sap beetles and mycotoxins in maize. *Food Addit. Contam.* 12, 497-508.
- 48 Sobek E.A., Munkvold G.P. (1999) European corn borer larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J. Econ. Entomol.* 92, 503-509.
- 49 Brookes G. (2002) The farm level impact of using Bt maize in Spain. 1-23.  
[http://www.europabio.org/pages/ne\\_gbgmcrops.asp](http://www.europabio.org/pages/ne_gbgmcrops.asp).
- 50 Brake J., Vlachos P. (1998) Evaluation of transgenic Event 176 "Bt" corn in broiler chickens. *Poultry Science* 77, 648-653.
- 51 Munkvold P., Hellmich R.L. (1999) Comparison of fumonisin concentration in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non transgenic hybrids. *Plant Dis.* 83, 130-138.
- 52 Dowd P.F. (2000) Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *J. Econ. Entomol.* 93, 1669-79.
- 53 Pietri A., Piva G. (2000) Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. In Proceedings 6<sup>th</sup> International Feed Production Conference, Piacenza - Italie, 17-28 novembre 2000, pp226-236.
- 54 Aulrich K., Bohme H., Daenicke R., Halle I., Flachowsky G. (2001) Genetically modified feeds in animal nutrition 1st communication : *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition. *Arch. Anim. Nutr.* 3, 183-195.
- 55 Dowd P.F. Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *J. Econ. Entomol.* 94 (2001) 1067-74.
- 56 Munkvold P., Faust M., Schnitzler J.A. (2002) Influence of genotype and infestation with European cornborer for nutritive value and quality of fresh and ensiled material from Bt and non Bt corn. *J. Anim. Sci.* 80 Suppl. 1 301 (Abst. 1119).
- 57 Cahagnier B., Melcion D. (2000) Mycotoxines de *Fusarium* dans les grains de maïs à la récolte; relation entre la présence d'insectes (pyrales, sésamie) et la teneur en mycotoxines. In Proceedings 6<sup>th</sup> International Feed Production Conference, Piacenza – Italie, 27-28 novembre 2000, pp237-249.
- 58 Piva G., Morlacchini M., Pietri A., Rossi F., Prandini A. (2001) Growth performance of broilers fed insect protected (MON810) or near isogenic control corn. *J. Anim. Sci.* 79 Suppl. 1 320 (Abst. 1324).
- 59 Aumaître A.L. (2002) Les aliments issus de plantes génétiquement modifiées: équivalence, efficacité et sécurité chez les animaux de ferme. *INRA Prod. Anim.* 15, 97-108.
- 60 Piva G., Morlacchini M., Pietri A., Piva A., Casadei G. (2001) Performance of weaned piglets fed insect-protected (MON810) or near isogenic corn. *J. Anim. Sci.* 79 Suppl. 1 106 (Abst. 441).
- 61 Gianessi L.P., Silvers C.S., Sankula S., Carpenter J.E. Plant Biotechnology: Current and Potential Impact For Improving Pest Management In U.S. Agriculture: An Analysis of 40 Case Studies. Juin 2002.  
<http://www.ncfap.org/40CaseStudies.htm>.
- 62 Moreno O.J., Kang M.S. (1999) Aflatoxins in maize: the problem and genetic solutions. *Plant Breed.* 118, 1-16.
- 63 Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109.
- 64 Hain R., Reif H.J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stocker R.H. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
- 65 Masoero F., Moschini M., Rossi, Prandini A., Pietri A. (1999) Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (CRYI A(B) grown in northern Italy. *Maydica* 44, 205-209.

- 66 Roe, R. M. Vertebrate toxicology of the solubilized parasporal crystalline proteins of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In *Reviews in Pesticide Toxicology 1: Toxicological Studies of Risks and Benefits*. Hodgson, E., Roe, R. M. and Motoyama, N., Eds. North Carolina State University, Raleigh, NC, 1991.10-148

## Annexe

### PAPILLON MONARQUE ET MAÏS Bt

#### Quelques rappels "historiques"

En août 1995, l'Environmental Protection Agency (EPA) enregistre le premier maïs génétiquement modifié pour la résistance à la pyrale (maïs Bt) [1].

En mai 1999, une note apparaît dans *Nature* disant que le pollen du maïs Bt est dangereux pour le papillon Monarque [2]. Transgenic pollen harms monarch larvae, *Nature*, 399, 214).

En novembre 1999 : le premier workshop sur "monarch/Bt corn" est tenu.

En décembre 1999 : l'EPA lance un appel pour obtenir des données sur le maïs Bt.

En juillet 2000 : un article avec comité de lecture scientifique est publié indiquant une absence de toxicité du pollen du maïs Bt sur les larves de Monarques dans les conditions de culture au champ [3].

En octobre 2000, l'EPA sponsorise un panel de conseiller scientifique à Washington D.C. [4].

Le 9 octobre 2001 : un numéro des *Proceedings of the National Academy of Science* publie une série de 6 articles sur les recherches coopératives faites sur le sujet [5-10].

#### **Le 16 octobre 2001, l'EPA autorise à nouveau la culture du maïs Bt [11].**

#### Contexte

Dès 1995, avant d'autoriser le maïs Bt, l'EPA avait conclu qu'il ne voyait pas d'effets adverses de la culture du maïs Bt y compris sur les papillons [1].

La conclusion de l'EPA était basée sur le fait que le papillon Monarque ne se pose pas sur le maïs mais plutôt sur les mauvaises herbes entourant cette culture. Le fait que le pollen se disperse sur une faible distance autour du maïs limite, de fait, l'exposition ainsi que la faible concentration de ce pollen sur des mauvaises herbes avoisinantes.

Mais en 1999, un article dans *Nature* [2] indique que si les larves se nourrissent de pollen de Bt répandu sur les mauvaises herbes ("milkweeds"), elles croissent plus lentement et meurent beaucoup plus que celles étant sur ces "milkweeds" dépourvues du pollen du maïs Bt.

Malgré des précautions (les auteurs disent que les résultats ne sont pas extrapolables aux conditions de culture au champ), les médias sortent les résultats de leur contexte et ne mentionnent pas les réserves faites. L'Europe réagit en bloquant les nouveaux dossiers d'autorisation de mise sur le marché, puis différentes associations « anti-OGM » réclament un moratoire aux USA.

#### Les chercheurs répondent

Tout d'abord lors d'un colloque qui se tient à Chicago en novembre 1999. Dès cette époque et bien que les résultats soient encore préliminaires, ils fournissent des arguments montrant qu'il est peu probable que le papillon Monarque puisse être affecté par le pollen du maïs Bt.

9 autres colloques suivront. L'un d'entre eux s'est tenu à Kansas City et 40 scientifiques appartenant à différentes communautés y participèrent (universités, gouvernement, industrie et environnement). Ils définirent des priorités de recherches, des projets furent sélectionnés, financés par des bourses (pour un total supérieur à 200 000 US\$) et supervisés par un comité représentant les divers protagonistes. Les études étaient focalisées sur l'exploration des effets (éventuels) du pollen du maïs Bt sur les Monarques dans des conditions typiques de croissance des maïs au champ.

Un point important est que les scientifiques décidèrent d'utiliser des méthodes qui génèrent des données directement comparables d'une étude à l'autre. Cela permit de rassembler toutes les informations obtenues dans toute la zone de culture du maïs aux USA et au Canada.



## L'EPA agit

Elle pose plusieurs questions à l'industrie des Biotechnologies en leur donnant une date limite pour y répondre. Les secteurs public et privé regroupent toutes les données disponibles concernant : les zones d'habitat du Monarque et son comportement, la dispersion du pollen de maïs, la distribution du "milkweed", la toxicité de la protéine Bt et du pollen du maïs Bt sur le Monarque.

Elle crée un "scientific advisory panel" (SAP) constitué d'experts en charge du réexamen des autorisations de maïs Bt et d'examiner les nouvelles données concernant le Monarque entre 1999 et 2000.

## Les chercheurs rendent leurs conclusions

### \* Etude des "Swallowtails"

Durant l'été 2000, des chercheurs de l'université de l'Illinois font état d'une étude montrant l'absence de toxicité du pollen Bt sur le "swallowtail" dans des conditions normales de culture au champ. Excepté pour le maïs Bt 176, les chercheurs ne trouvent pas une mortalité supérieure du Monarque, même à des doses de pollen 5 fois supérieures de celles typiquement trouvées dans les champs.

### \* Etudes sur le Monarque

39 chercheurs américains et canadiens ont conduit des études au champ en 1999 et 2000 pour évaluer en détail tout impact du pollen de maïs Bt sur le papillon Monarque. Des spécialistes des mauvaises herbes, du maïs, des entomologistes et d'autres ont mis en commun leur expertise pour analyser les données ce qui a permis de développer rapidement une image complète du problème. Cela a conduit à la publication de 6 articles dans les *Proceedings of the National Academy of Sciences* en octobre 2001 [5-10].

Différents points examinés :

- La sensibilité des larves de Monarque aux toxines purifiées et au pollen des différents maïs Bt contenant les gènes *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry9C* & *Cry1F*. Elles ont été testées soit :
  - en tant que toxines purifiées et incorporées dans un régime spécifique ;
  - à partir de pollen de maïs Bt hybrides appliqués directement sur des disques foliaires de "milkweeds" ;
  - à partir de pollen Bt récupéré d'épis et appliqués sur des disques foliaires de "milkweeds".Les principales conclusions de cette étude indiquent que seul le pollen issu de l'événement maïs Bt 176 peut affecter les larves de Monarques.
- Les périodes de recouvrement entre la présence des larves du papillon et la dissémination du pollen de maïs.
- Le dépôt du pollen sur les "milkweeds" et dans les champs de maïs voisins.
- L'identification du risque de l'impact du pollen Bt sur les populations de Monarque, la conclusion étant que le risque est négligeable.
- L'évaluation de l'impact de la toxine Cry1AB exprimée dans le pollen du maïs Bt sur les larves du Monarque dans les conditions normales de culture au champ.

## Conclusions

De toutes ces études, il ressort clairement que le risque pour les larves du papillon Monarque d'être affectées par la consommation de pollen issus de maïs Bt, soit sur des "milkweeds" (qui est leur habitat privilégié), soit même sur des feuilles de maïs, est négligeable.

Si l'article de Losey *et al.* [2] a fait prendre conscience tant aux biotechnologues qu'au grand public d'un effet négatif non ciblé potentiel d'une plante transgénique Bt, il a eu pour effet de provoquer tout d'abord, un ensemble de réactions négatives de la part d'organisations peu favorables au développement des biotechnologies mais, parallèlement, une réaction très rapide de la communauté scientifique puisqu'en l'espace de deux années [5-17], elle a été capable d'apporter des réponses aux questions qui avaient été soulevées et, finalement, de conclure que l'utilisation de maïs Bt représentait un environnement plus sûr pour le papillon Monarque que l'utilisation des insecticides chimiques.

## Références bibliographiques

- 1 U.S. Environmental Protection Agency. *Pesticide fact sheet for Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki Cry1(A)b delta-endotoxin and the genetic material necessary for the production (plasmid vector pCIB4431) in corn*. EPA Publication No. EPA731-F-95-004 (1995). Washington, D.C.
- 2 Losey J.E., Rayer L.S., Carter M.E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399, 214.
- 3 Wraight C.L., Zangerl A.R., Carroll M.J., Berenbaum M.R. (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7700-7703.
- 4 U.S. Environmental Protection Agency. Bt plant-pesticides biopesticides registration action document. 2000. [www.epa.gov/scipoly/sap/2000/#october](http://www.epa.gov/scipoly/sap/2000/#october).
- 5 Hellmich R.L., Siegfried B.D., Sears M.K., Stanley-Horn D.E., Daniels M.J., Mattila H.R., Spencer T., Bidne K.G., Lewis L.C. (2001) Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 11925-11930.
- 6 Oberhauser K.S., Prysby M.D., Mattila H.R., Stanley-Horn D.E., Sears M.K., Dively G.P., Olson E., Pleasants J.M., Lam W-K.F., Hellmich R.L. (2001) Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11913-11918.
- 7 Pleasants J.M., Hellmich R.L., Dively G.P., Sears M.K., Stanley-Horn D.E., Mattila H.R., Foster J.E., Clark P.L., Jones G.D. (2001) Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11919-11924.
- 8 Sears M.K., Hellmich R.L., Stanley-Horn D.E., Oberhauser K.S., Pleasants J.M., Mattila H.R., Siegfried B.D., Dively G.P. (2001) Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11937-11942.
- 9 Stanley-Horn D.E., Dively G.P., Hellmich R.L., Mattila H.R., Sears M.K., Rose R., Jesse L.C.H., Losey J.E., Obrycki J.J., Lewis L.C. (2001) Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11931-11936.
- 10 Zangerl A.R., McKenna D., Wraight C.L., Carroll M., Ficarello P., Warner R., Berenbaum M.R. (2001) Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11908-11912.
- 11 U.S. Environmental Protection Agency. Biotechnology corn approved for continued use. [News release (16 octobre 2001)].
- 12 Jesse L.C.H., Obrycki J.J. (2000) Field deposition of *Bt* transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia* 125, 241-248.
- 13 Jones G.D. (2001) Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11913-11918.
- 14 Minorsky P.V. (2001) The monarch butterfly controversy. *Plant Physiol.* 127, 709-710.
- 15 Shelton A.M., Sears M.K. (2001) The monarch butterfly controversy: Scientific interpretations of a phenomenon. *Plant J.* 27, 483-488.
- 16 Irwin R., Krishna P.J. Nontarget impacts of *Bt* corn: A risk assessment. *Information Systems for Biotechnology (ISB) News Report* (2002), pp. 6-8.
- 17 Gianessi L.P., Silvers C.S., Sankula S., Carpenter J. *Plant biotechnology: Current and potential impact for improving pest management in U.S. agriculture, An analysis of 40 case studies*. Washington, D.C.: National Center for Food and Agricultural Policy. 2002.
- 18 Gatehouse A.M.R., Ferry N., Raemaekers R.J.M. (2002) The case of the monarch butterfly: A verdict is returned. *Trends in Genetica* 18, 249-251.

# LA BETTERAVE TOLERANTE AU GLYPHOSATE

---

## 1 OBSERVATIONS PRELIMINAIRES SUR LE CHOIX DE CETTE PRODUCTION

Le choix de la betterave tolérante au glyphosate comme un exemple de plante OGM sur laquelle on pouvait s'appuyer pour documenter les bénéfices attendus au plan de la santé humaine repose sur les éléments suivants.

- Tout d'abord, la culture de la betterave sucrière correspond à une production industrielle. Les éléments techniques de production, de transformation et de commercialisation sont intégrés dans une filière.
- La production (généralement sous forme contractuelle) se fait à partir de semences monogermes acquises chaque année; la traçabilité est possible. Les betteraves sont des plantes bisannuelles ; les graines sont obtenues la seconde année. La betterave sucrière n'offre pas de risque de pollinisation d'espèces voisines et donc de transmission de gènes (OGM ou non) puisque la racine est récoltée la première année.
- Sa valorisation industrielle se fait grâce au procédé de cristallisation pour aboutir au sucre, le procédé permettant le contrôle sinon l'élimination des éléments indésirables (fibres, polyphénols, contaminants, etc.).
- Cette culture fait classiquement l'objet d'apports fréquents d'herbicides non dénués de risque pour le producteur et l'environnement.
- Enfin, notons que la betterave fourragère, qui est moins répandue et destinée à l'alimentation animale, est produite selon un itinéraire technique similaire à celui de la betterave sucrière.

Ainsi, comparativement à d'autres cultures telles que le maïs ou le colza où des risques de contamination pollinique (flux de gènes) peuvent se produire, la culture de la betterave OGM offre, hors des zones de production de semence, des conditions apparemment contrôlées, sinon contrôlables au sein d'une filière bien intégrée. Il convient donc d'examiner en quoi la culture de la betterave OGM tolérante au glyphosate peut apporter un ou des bénéfices pour la santé.

## 2 RAPPELS SUR LA PRODUCTION DE LA BETTERAVE

La production de la betterave sucrière en France avoisine 400 000 ha. Elle est concentrée essentiellement dans le Nord, l'Alsace et le Puy de Dôme. Cette culture très localisée par rapport aux sucreries est en régression ; de 438 000 ha en 2002 elle passe à 395 000 ha en 2003 qui se répartiraient ainsi : 356 000 ha pour la production de sucre, 28 500 pour l'alcool de souche et 11 000 ha pour l'éthanol.

La betterave fourragère est cultivée sur moins de 20 000 ha en France, principalement par ordre décroissant en surface, la Seine Maritime, le Pas de Calais, l'Eure, les Côtes d'Armor, le Nord, l'Ille-et-Vilaine, la Somme et le Morbihan. Bien que les surfaces tendent à décroître, cette production (15 à 20 t de matière sèche/ha) est un des seuls fourrages permettant de sécuriser les systèmes "herbes pâturée plus foin" tout en augmentant la valeur énergétique de la ration de base des vaches laitières. En conséquence sa superficie tend à croître dans les zones d'AOC fromagères où l'utilisation des ensilages est déconseillée.

L'amélioration génétique des betteraves sucrières et fourragères est réalisée par une dizaine d'établissements de sélection en France et en Europe. Chaque année de nouvelles variétés sont inscrites au catalogue français qui compte en 2003 respectivement 93 et 37 variétés sucrières et fourragères. Depuis 25 ans les rendements moyens en betterave ont fortement progressé, notamment en sucre blanc par hectare puisqu'il est passé de 7 t/ha en 1977 à 11,8 t/ha en 2002 ce qui constitue un record [1].

Ce résultat est le fruit de progrès génétiques mais aussi des techniques de production dont le désherbage représente une part importante dans la réussite de cette culture.

### 3 POURQUOI DESHERBER LA CULTURE DE BETTERAVE ?

Le développement et le rendement de la betterave sont largement influencés par le climat. La lumière est un facteur déterminant, pendant la période comprise entre la couverture du sol et la récolte, notamment pour la fabrication du sucre. La fixation du CO<sub>2</sub> et sa conversion en sucre suit précisément l'évolution du rayonnement au cours de la journée ; il a été rapporté 1,72 gr de matière sèche (soit 1 gramme de sucre) par mégajoule de lumière interceptée par m<sup>2</sup> [1]. Pour cette raison il est indispensable d'obtenir une couverture rapide du sol et son maintien dans des conditions sanitaires optimales jusqu'à la récolte afin de bénéficier du maximum de cette radiation solaire.

Avant les années 70, le désherbage était essentiellement manuel et nécessitait 120 heures de travail par hectare. Le désherbage mécanique (scarification, binage) est incomplet. Le développement du désherbage chimique représente une solution qui est aujourd'hui largement utilisée par les producteurs de betteraves.

### 4 LES HERBICIDES CLASSIQUEMENT UTILISES

Plusieurs molécules sont utilisées dans le désherbage de la betterave principalement contre les dicotylédones mais aussi contre des graminées. En France, ce sont majoritairement les molécules suivantes qui sont utilisées : Chloridazone, Cycloxydime, Ethofumesat, Lenacile, Metamitron, Phenmedipham et Triflurosulfuron-méthyle. Ces molécules constituent la matière active de l'herbicide qui comprend aussi des adjuvants (solvant, agent mouillant, etc.). Ces matières actives sont passées dans le domaine public et les sociétés fabricantes des produits phytosanitaires proposent plusieurs formulations, dont elles détiennent la propriété, incluant ces matières actives et des adjuvants qui sont des agents chimiques tels que le xylène, l'oxyde d'éthylène, des huiles minérales paraffiniques, des alcool terpéniques, des polymères complexes d'éthylène et de propylène, etc. Dans le cadre de l'harmonisation européenne des produits phytosanitaires, ces formulations sont appelées à disparaître en 2006 au profit de celles incluant comme adjuvant des huiles végétales ne nécessitant pas de classement toxicologique.

Quelques caractéristiques toxicologiques de ces molécules actives sont rassemblées dans le tableau 1 (LMR : limite maximale de résidus, DJA : dose journalière admissible).

**Tableau 1** : Caractéristiques des molécules actives appliquées à la culture de la betterave

Nom de la matière active	Toxicité (rat)		DJA mg/kg p.c./j	LMR sur betterave mg/kg	Classement toxicologique*
	par voie orale DL50 (mg/kg p.c.)	par inhalation CL50 (mg/L d'air)			
Chloridazone	2200	>5,4	ND	0,500	Xi N R43 R50 553
Cycloxydime	>2000	>5,28	0,06	0,100	exempté
Ethofumesat	>5000	>0,3	0,07	0,100	N R51 R53
Lenacile	>5000	ND	ND	ND	exempté
Metamitron	1830-3343	>0,33	0,025	0,050	Xn N R22 R50 R53
Phenmedipham	>8000	ND	0,03	0,100	N R50 R53
Triflurosulfuron-méthyle	>5000	>5,1	0,04	0,020	exempté
Glyphosate	>2000	>5,0	0,3	sur légume 0,100	Xi N R41 R51 R53

\* Légende :

ND : non déterminé ; Xi : Irritant ; Xn : Nocif ; N : Nature

R22 : Nocif en cas d'ingestion

R41 : Risque de lésions oculaires graves

R50 : Très toxique pour les organismes aquatiques

R51/ R53 : Toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

source : AGRITOX [2]

Les traitements sont appliqués en pré-levée sur environ 65 % des surfaces, généralement entre le 20 mars et le 1<sup>er</sup> avril, puis en post-levée. Deux, voire quatre passages, sont successivement réalisés ensuite en post-levée de la betterave (entre le stade cotylédons et le 1<sup>er</sup> juin) sur la totalité des cultures en répandant un mélange de trois ou quatre de ces molécules dès l'apparition des mauvaises herbes. Par exemple, pour chacun de ces passages, on a classiquement les doses suivantes [3] (tableau 2).

**Tableau 2** : Exemples de doses d'herbicides (matière active) appliquées par traitement

Nom	Dose appliquée	
	kg/ha	Matière active g/ha
Ethofumesat	0,6	120
Metamitron	2	700
Phenmedipham	1,2	192

Le masse totale d'herbicide appliquée pour la culture peut ainsi atteindre avec trois traitements 12 kg/ha soit environ **2,7 kg de matières actives par ha** d'après les enquêtes réalisées sur plusieurs années en France par l'Institut technique de la betterave [1].

Ces doses peuvent être comparées à celles qui seraient appliquées sur une culture de betterave génétiquement modifiée (GM) et tolérante au glyphosate. Dans ce cas, il n'y aurait pas de traitement en pré-levée mais seulement deux, voire trois, passages en post-levée espacés de 10 à 15 jours. Les doses recommandées par passage se situeraient entre 2 et 3 kg de produits soit de 720 à 1000 g de matière active par ha. La masse totale d'herbicide pour la culture de cette betterave tolérante au glyphosate atteindrait 4 à 6 kg/ha soit **1,4 à 2,1 kg de matière active par ha** [1,3]. Cette dose est en fait assez proche mais cependant inférieure à celle utilisée pour une production avec les herbicides conventionnels.

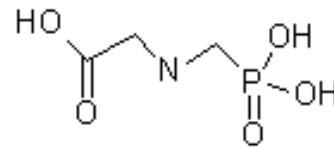
Avant de tenter de dégager les avantages pour la santé de la culture de la betterave GM tolérante au glyphosate, il convient d'examiner plus en détail la modification génétique apportée à la betterave et l'action de cet herbicide.

## 5 LA BETTERAVE OGM

Pour être génétiquement tolérante au glyphosate, la plante GM doit intégrer plusieurs gènes : le gène de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), le gène de la 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase et un gène de la glyphosate oxydo-reductase (GOX) [4,5]. Ces trois gènes qui sont souvent d'origine bactérienne (*Agrobacterium tumefaciens* pour l'EPSPS et *Achromobacter* pour la GOX) permettent de contourner l'effet du glyphosate sur l'EPSPS et de dégrader (en partie ou en totalité), précisément par l'action de la GOX, le glyphosate en acide amino-méthyle-phosphonique (AMPA). Ces gènes sont introduits dans *Agrobacterium tumefaciens* qui est utilisé comme agent de la transformation des cotylédons de la betterave. Des plantules sont régénérées à partir de ces cotylédons par culture *in vitro*. Les plants GM sont sélectionnés par utilisation conjointe des marqueurs moléculaires des gènes introduits et par application de l'herbicide. Il a été observé une corrélation négative entre le nombre de copie des transgènes et le niveau de tolérance au glyphosate. Les betteraves GM ayant une seule copie des transgènes ont montré le niveau le plus élevé de tolérance au glyphosate [4]. La transformation n'est pas obtenue avec le même succès selon le génotype de la betterave.

## 6 MODE D'ACTION DU GLYPHOSATE

La molécule de glyphosate ou N –phosphonométhyle glycine est un herbicide non sélectif à très large champ d'action. Son mode d'action est systémique et non par simple effet de contact local.



Le glyphosate se déplace dans la sève, se retrouve dans les différents tissus végétaux et se concentre dans les zones méristématiques. Cette molécule inhibe la synthèse de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) qui est une enzyme clé de la biosynthèse de trois acides aminés aromatiques chez les microorganismes et les plantes. Les animaux sont dépourvus de l'acide shikimique ainsi que de l'enzyme EPSPS et doivent donc trouver ces acides aminés aromatiques dans leur alimentation. Le glyphosate se lie de manière irréversible à l'EPSPS qui catalyse la réaction du shikimate-3-phosphate et du phosphoenolpyruvate pour donner le 5-enolpyruvateshikimate-3-phosphate. Cette réaction se produit dans le chloroplaste.

Le glyphosate n'est jamais appliqué en l'état. On le trouve, selon les formulations souvent sous forme de sel d'isopropylamine glyphosate et bien évidemment, comme beaucoup d'herbicides, associé à des agents surfactants (dits inertes). La formulation contenant le glyphosate qui serait appliquée à la betterave GM serait vraisemblablement celle commercialisée sous le nom "Roundup Bioforce"; c'est à dire sous forme de sel d'isopropylamine sans amines éthoxylées (tensioactifs souvent phytotoxiques). Notons toutefois que les composés généralement présents dans les formulations d'herbicides à base de glyphosate sont loin d'être sans effets sur la santé (tableau 3), cette remarque s'appliquant d'une façon générale à l'ensemble des pesticides.

**Tableau 3** : Liste des principaux composés présents, seuls ou en combinaison, dans les formulations commerciales à base de glyphosate ou de sel de glyphosate [6]

Nom	Effets attribués
Benzisothiazolone	eczéma, irritation de la peau [7]
Isobutane	nausée, difficulté respiratoire [8]
Isopropylamine	attaque des muqueuses, nausée, mal de tête [9]
Méthyl pyrrolidinone	irritation des yeux, avortement sur animaux de lab. [10]
Sulfate d'ammonium	irritation des yeux, allergie respiratoire [8]
Sulfate de sodium	irritation des yeux, de la peau, vomissement [11]
Tallowamine polyéthoxylée (POEA)	brûlure de yeux, nausée, diarrhée [12]
3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC)	irritation des yeux, avortement sur animaux de lab. [13]

L'évaluation au plan statistique des risques pour la santé de l'application du glyphosate ne peut, pour l'instant, être réalisée indépendamment de l'effet de l'un ou de plusieurs de ces composés. Néanmoins, en s'appuyant sur plusieurs des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques de ces molécules, des comparaisons sont possibles quant aux risques potentiels pouvant être associés à leur usage.

## 7 COMPARAISON DES EFFETS DES HERBICIDES CONVENTIONNELS ET DU GLYPHOSATE

### 7.1 SUR LE MODE D'ACTION DE CES HERBICIDES

Schématiquement, un herbicide agit par contact et pénétration dans la plante : les physiopathologistes distinguent trois modes d'action :

- (1) par contact, la plante meurt sans qu'il y ait une pénétration de l'herbicide dans le phloème,
- (2) par pénétration peu étendue entraînant la mort de la plante avec accès au phloème et transport de la molécule dans les feuilles,
- (3) par transport dans les deux types de sèves et accumulation aussi bien dans les feuilles que dans les racines ; le produit est dit alors systémique.

Le mode d'action (1) est celui de l'ethofumesat, et du phenmedipham. Le chloridazone et le triflurosulfuron-méthyle sont dits relativement peu mobiles et se retrouvent au niveau des feuilles. Or, rappelons que c'est la racine, d'où sont extraits les sucres, qui est ingérée par les animaux.

Les herbicides systémiques tels que le cycloxydime, le lenacile, la métamitronne et le glyphosate pourraient se trouver au niveau de l'organe de réserve : la racine. En fait, bien que leurs limites maximales de résidus (LMR) soient équivalentes, la betterave GM devrait en contenir moins puisque le glyphosate est précisément métabolisé, sinon contourné, par les enzymes issues des transgènes. Or, il semble que (i) selon les espèces (colza, maïs notamment), (ii) selon l'élément de transformation intégré dans la plante GM, et (iii) selon les conditions de culture, les résidus peuvent avoir plusieurs formes et aller de 100 % de glyphosate et 0 % d'acide amino-méthyle-phosphorique (AMPA) à quelques pour cent de glyphosate et presque 100 % d'AMPA (Cujier, 2003, com. pers.). L'AMPA est aussi considéré par les toxicologues comme un résidu pour lequel une mesure doit être faite au même titre que celle du glyphosate dans les plantes GM. De nouveaux événements de transformation ont été mis au point qui dégraderaient cet AMPA [14]. Il conviendra donc de vérifier si ces produits sont bien catabolisés dans l'organe de réserve de la betterave GM.

Rappelons enfin que les LMR sont obtenues à partir de la détermination de la dose sans effet (DSE) affectée d'un coefficient de sécurité et qu'elles s'appliquent sur la betterave entière (racine + feuilles). En conséquence, les doses d'herbicides dans la racine sont généralement inférieures à la LMR et aussi du fait que, quel que soit son mode d'action, le produit peut avoir été en partie ou en totalité dégradé (les applications se font 3 mois avant la récolte).

Nous pouvons conclure que, bien que la betterave GM puisse contenir moins d'herbicide, l'avantage de l'emploi du glyphosate n'est pas ici établi car les autres herbicides sont également en très faible quantité voire inexistant au stade de la récolte. La mesure des résidus dans les organes utilisés pour la consommation est bien évidemment effectuée par les laboratoires compétents avant toute homologation d'un herbicide.

## **7.2 SUR LES CONSEQUENCES RESULTANT D'UN LESSIVAGE**

La pluie peut entraîner l'herbicide et la concentration de celui-ci dans les eaux de ruissellement, dans les cours d'eau et les nappes phréatiques peut être très variable. Il a été observé par exemple que les eaux de pluie en 2000 ont été moins contaminées que celles de l'année 1996 [15]. Des nappes phréatiques sont contaminées par de l'atrazine, herbicide aujourd'hui interdit d'usage en France.

Indépendamment de l'intensité et de la fréquence des pluies, du relief, de la proximité ou non de cours d'eau ou de nappes phréatiques, au moins deux caractéristiques physico-chimiques des herbicides doivent être prises en compte pour pouvoir les comparer à ce sujet : leur solubilité et leur stabilité dans l'eau. Le tableau 4 présente ces deux caractéristiques relevées dans la base Agritox [2], qui doivent également être établies préalablement à l'homologation de chacune des matières actives.

**Tableau 4** : Quelques caractéristiques physico-chimiques de matières actives herbicides.

<b>Matière active</b>	<b>Solubilité dans l'eau</b> mg/L	<b>Stabilité dans l'eau</b>	<b>Constante de Henry</b> Pa*m <sup>3</sup> /mole	<b>Liposolubilité</b> Log P
Chloridazone	340	> 24 h	3,7	2,7
Cycloxydime	40	234 jrs ( à pH 7)	ND*	2,31
Ethofumesat	40	stable (>2000 jrs à pH 5)	6,8 10 <sup>-4</sup>	2,7
Lenacile	6	stable	ND	2,31
Metamitron	1820	410 jrs(pH4), 30 jrs(pH 7)	1 10 <sup>-7</sup>	0,83
Phenmedipham	3,1	20 h (pH 7)	8,3 10 <sup>-8</sup>	3,59
Triflurosulfuron-méthyle	110	32 jrs	2,4 10 <sup>-3</sup>	1,95
Glyphosate	10500	> 30 jrs	2,1 10 <sup>-7</sup>	-3,2

\* ND non déterminé

Source : AGRITOX[2]

On constate que les différents herbicides employés sur la betterave n'ont pas la même solubilité dans l'eau. On relève que le glyphosate est de 5 fois à 3300 fois plus soluble dans l'eau que les herbicides conventionnels.

La stabilité est évaluée par le temps de dégradation de 50 % de la substance active (DT50) dans l'eau, exprimé en jours ou en heures à un pH donné. Le phenmedipham, très toxique pour les organismes aquatiques, a fort heureusement une faible solubilité et stabilité. En revanche, on constate que la métamitron et surtout le glyphosate sont des molécules qui peuvent agir sur d'autres organismes (faune bactérienne et tellurique) ou peuvent se retrouver dans l'eau de puits en raison précisément de leur solubilité et stabilité dans l'eau. Dans la formulation la plus courante du glyphosate, le Roundup est connu pour avoir un effet très nocif sur la faune aquatique [16].

L'action de ces molécules sur les microorganismes, sur la faune aquatique et plus généralement sur l'environnement ne sera pas abordée dans ce rapport. Rappelons seulement que les études pluriannuelles, conduites en Angleterre sur la betterave GM tolérante aux herbicides, ont révélé que le recours à cette culture aurait un effet réel sur la flore mais aussi sur la biodiversité des insectes [17]. Il est nécessaire cependant d'examiner ici quels sont les risques pour la santé liés à l'usage de ces herbicides notamment pour les agriculteurs et les personnes vivant en milieu rural.

### 7.3 SUR LA CONTAMINATION DE L'AIR

Les analyses faites sur la contamination de l'air lors d'un épandage montrent que les 50 à 100 premiers mètres autour de la parcelle sont fortement contaminés et que des concentrations de l'ordre de 5 à 10 microgrammes par mètre cube peuvent être relevées [15]. Or, si nous consommons deux litres d'eau par jour, nous respirons entre quinze et dix huit mètres cubes d'air également par jour. Il est donc très important d'examiner l'aptitude qu'ont ces molécules herbicides à se volatiliser. La constante de Henry caractérise l'aptitude d'une substance active en solution à se volatiliser. Elle s'exprime en Pascal x m<sup>3</sup>/mole et l'on constate, tableau 4, que de grandes différences existent entre ces molécules. Le chloridazone est une molécule très volatile alors que le phenmedipham et le glyphosate passent plus difficilement à l'état de vapeur lorsqu'elles sont en solution dans l'eau. Les risques associés à l'usage de ces molécules sont d'abord fonction de ce qui sera volatilisé dans l'air. On considère, en matière d'efficacité des herbicides, que le pourcentage de perte par contamination aérienne représente quelques dizaines de pour cent de la matière active appliquée alors que l'entraînement par lessivage ne dépasserait pas en moyenne 1 % [15].

De ces observations, il apparaît que les risques pour la santé des personnes vivant dans les zones rurales sont en premier lieu à rechercher en relation, avec la volatilité des substances. Sur cette base le glyphosate, comme la métamitron et le phenmedipham, présentent un moindre risque d'atteinte de la santé comparativement à ce qui est encouru par l'emploi du chloridazone.



## **7.4 SUR LA BIO-ACCUMULATION DES SUBSTANCES**

L'étude de l'impact sur l'environnement de l'usage répété des herbicides et en particulier du glyphosate a fait l'objet de nombreuses publications. Pour la santé, il est important que ces herbicides ne soient pas présents (sinon à une dose inférieure à la DJA) dans l'air, dans l'eau et les aliments. Rappelons que la DJA est fixée soit par la commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole soit par la Commission de l'Union Européenne, soit par des instances internationales (FAO/OMS).

En cas d'ingestions répétées, il convient d'examiner si le produit est susceptible de bio-accumulation. Pour cela, les toxicologues disposent notamment du coefficient P de partage octanol/eau. Cette grandeur sans dimension, définie à une température et un pH donnés, est souvent exprimée en logarithme décimal. Log P est un indicateur de liposolubilité d'une substance. Si  $\log P \geq 3$  la substance active est susceptible de bio-accumulation. Le tableau 4 nous montre que le phenmedipham présente de sérieux risques de bio-accumulation alors que le glyphosate est la molécule la plus intéressante à cet égard. Les autres herbicides rapportés dans ce tableau ont un coefficient inférieur à 3.

## **8 AVANTAGES DE LA BETTERAVE TOLERANTE AU GLYPHOSATE**

Nous avons vu que la dose de matière active appliquée à la culture de betterave GM tolérante au glyphosate nécessiterait de 22 à 48% de matière active en moins à l'hectare qu'une production utilisant les herbicides conventionnels. Il s'agit là d'une économie, notamment de passages, et aussi un moindre risque pour l'applicateur et son environnement. Ce risque de contamination aérienne est d'autant plus diminué que précisément le glyphosate est une molécule parmi les moins volatiles. Cet herbicide a aussi l'avantage d'être très peu liposoluble, offrant ainsi une moindre chance de se retrouver dans le lait et le fromage produits dans les zones où la betterave fourragère est cultivée. La faible liposolubilité du glyphosate que l'on peut traduire en moindre risque de bio-accumulation est aussi un élément en faveur de cet herbicide comparativement à la plupart des autres employés sur la betterave.

## **9 GLYPHOSATE ET ENVIRONNEMENT**

Les avantages évoqués ci-dessus ne doivent pas occulter cependant la très forte hydrosolubilité du glyphosate (la plus élevée de toutes les molécules utilisées sur la betterave) ainsi qu'une assez grande stabilité dans l'eau. Les conséquences de ces deux caractéristiques sont connues des fabricants puisque l'analyse toxicologique de cette molécule la range dans la catégorie des produits toxiques pour les organismes aquatiques et pouvant être néfastes à long terme pour ce milieu et l'environnement plus généralement. Il convient aussi de souligner les conséquences, maintes fois signalées dans la littérature, des applications répétées d'herbicides à base de glyphosate sur le vie microbiologique et l'évolution des sols (diminution de la matière organique et de la flore bactérienne, acidification des sols notamment). Or, on sait que cette vie microbienne est précisément importante dans le processus de détoxification et de purification des eaux. Nous avons aussi relevé la question des adjuvants, compléments importants qui facilitent la pénétration, voire le mode d'action de la matière active. Ces agents de formulation sont souvent préparés pour un type de culture. Il conviendra d'examiner leur nocivité sur l'environnement mais aussi sur la santé humaine, des affections ayant été relevées pour le Roundup par exemple (irritation des yeux et de la peau, nausée, douleurs abdominales...) [18-21].

## **10 CONCLUSION**

La culture de la betterave sucrière concerne environ 2,4 % de la surface agricole utile en France, soit 400 000 hectares. Le désherbage, essentiellement manuel jusque dans les années 1970, est assuré depuis lors par l'utilisation d'herbicides représentés majoritairement par 7 molécules. D'aucuns s'accordent à penser que l'usage des herbicides en général, du fait de l'application de Limites Maximales de Résidus (LMR) faibles, ne présente pas de risque particulier pour la santé. Dans le cas particulier de la betterave, les procédés physiques d'épuration et de cristallisation conduisent à une

absence de résidus d'herbicides détectables dans le sucre blanc. Dans ces conditions, il n'y a pas de bénéfice direct à attendre pour le consommateur à travers la consommation du produit fini issu de la betterave OGM tolérante au glyphosate.

Le problème se pose différemment pour l'agriculteur et de façon indirecte pour la santé publique, *via* l'environnement. Les caractéristiques physico-chimiques des molécules peuvent dans ce cas orienter vers un risque environnemental potentiel. La solubilité et la stabilité en milieu aqueux sont élevées pour le glyphosate par rapport à d'autres herbicides et constituent des éléments péjoratifs pour son utilisation. Par contre, sa faible liposolubilité et, par conséquent, un risque de bioaccumulation limité, constituent un avantage certain par rapport aux autres herbicides utilisés dans la culture des betteraves non OGM (non tolérantes au glyphosate). Le risque de dispersion dans l'air limité lors de l'épandage est également un atout pour le glyphosate, ce volet se traduisant essentiellement par un avantage pour l'agriculteur. Ces données semblent en accord avec les résultats des études rapportées à partir des indicateurs environnementaux de Yardstick [22] et I-Phy [19], favorables au glyphosate par rapport aux autres traitements conventionnels.

En conclusion, la betterave OGM (tolérante au glyphosate) ne modifie pas la qualité du produit fini qui en est issu. L'absence de contaminants tels que des pesticides, liés notamment au mode de production du produit fini à partir de betteraves non GM, ne permettait d'ailleurs pas d'attendre un quelconque bénéfice pour le consommateur à ce niveau. En revanche, la betterave tolérante au glyphosate pourrait présenter un intérêt pour l'agriculteur et, dans une certaine mesure, pour l'environnement. Les avantages potentiels, autres qu'économiques [23], nécessitent toutefois de disposer d'arguments mieux étayés par des études ciblées sur la population à risque. Ainsi, les effets bénéfiques potentiels attendus pour l'environnement dans le cadre d'une moindre utilisation d'herbicides, des caractéristiques de moindre volatilité et de moindre liposolubilité du glyphosate sont à rapprocher par exemple des conclusions d'une étude d'impact environnementale conduite par les autorités britanniques [17] rapportant que la culture de plantes tolérantes aux herbicides pourrait avoir un impact sur les populations de plantes dicotylédones sauvages, avec des conséquences sur les populations d'insectes et donc d'oiseaux consommant ceux-ci.

## Références bibliographiques

- 1 ITB Institut technique de la betterave, 45 r. de Naples 75008 Paris. site : [www.institut-betterave.asso.fr](http://www.institut-betterave.asso.fr)
- 2 AGRITOX 2003 Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. Site : [www.inra.fr/agritox/](http://www.inra.fr/agritox/)
- 3 Phipps R.H., Park J.R. (2002) Environmental benefits of genetically modified crops: global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *J. Animal Feed Sci.* 11, 1-18
- 4 Mannerlof M., Tuveesson S., Stenn P.O., Tenning P. (1997) Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica*, 94, 83-91.
- 5 Issa A.A., (1999) Interference of glyphosate with the shikimate pathway by Cyanobacteria in chemostat culture. *Microbios.* 395, 47-55.
- 6 Cox C. (1998) Glyphosat (Roundup). *J. Pesticide Reform.* 18, 3-17.
- 7 Damsira R.J., Van Vicien W.A., Van Ginkel C.J.W. Allergic contact dermatitis from the preservative 1,2-benzisothiazolin-3-one (1,2-BIT: Proxel®): a case report, its prevalence in those occupationally at risk and in the general dermatological population and its relationship to allergy to its analogue Kathon® CG. *Cont. Dermatit.* 27,105-109.
- 8 Monsanto Co, 1996. Material safety data sheet: Roundup Sure Shot Foam. [www.ortho.com/content/products/Solaris\\_mads/SOLMSDS](http://www.ortho.com/content/products/Solaris_mads/SOLMSDS), HTML, Aug.
- 9 Temple W.A., Smith N.A. (1992) Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. *N.Z. Med. J.* 105, 173-174.
- 10 Hass U., Jacobsen G.M., Lund S.P. (1995) Developmental toxicity of inhaled n-methylpyrrolidinone in the rat. *Pharm. Toxicol.* 76, 406-409.
- 11 Lodi A. Chiarelli G, Mancini LL, Crosti C. (1993), Contact allergy to sodium sulfite contained in antifungal preparation. *Cont. Dermatit* 29; 97.
- 12 Monsanto Co. (1997) Material safety data sheet: surfactant. [www.monsanto.com](http://www.monsanto.com). Aug.
- 13 Bryld L.E, Agner T, Rastogi SC, Menne T. (1997). Iodopropynyl butylcarbamate: a new contact allergen. *Cont Dermatit.* 36, 156-158.
- 14 Dale M.F.B., Dewar A.M., Fisherr S.J., Haydock P.P.J. Jaggard K.W. (1998) Transgenic herbicide tolerant sugar beet –present status and future developments. *Aspects Appl. Biology* 52, 273-278.
- 15 Seux R. (2003) Quelles sont les différentes sources de pollution des eaux ? Quelle est la part imputable aux produits phytosanitaires ? Quels sont les risques potentiels pour l'environnement et la santé ? In: "Pesticides : les enjeux du débat." UIPP ed. ISBN : 2-84541-061-1, 27-30.
- 16 Sopinska A., Grochola A., Niezgodna J. (2000) Influence of water pollution with Roundup herbicide on fish health. *Medycyna Weterynaryjna.* 56(9), 593-597.
- 17 ACRE Advice on the implications of the farm-scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. 13 January 2004, <http://www.defra.gov.uk/environment/gm/fse>.
- 18 Joost A.W., Reus A., PeterC. (2000) The Environmental Yardstick for Pesticides: a Practical Indicator Used in the Netherlands, Leendertse in Crop Protection 19, <http://www.cim.nl/en/crop/articles/yardstick.phtml>
- 19 Van der Werf H. M. G., Zimmer C. (1997) Un indicateur d'impact environnemental de pesticides basé sur un système expert à logique floue., *Le Courrier de l'Environnement*, 34. <http://indicateurs.agrienv..free.fr/fra/liens.html>
- 20 Adam A., Marzuki A., Rahman H.A., Aziz M.A. (1997) The oral and intracheal toxicities of Roundup and its components to rats. *Veterinary Hum. Toxicology.* 39(3), 147-151.
- 21 Eisenbrand G., Aulepp H., Dayan A.D., Elias P.S., Grinow W., Ring J., Schlatter J. (1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered plants: glyphosate tolerant soybean as a case study. Food allergies and intolerances: symposium. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 212-221

- 22 Richard-Molard D. (2002) Première approche de l'analyse des bénéfices de l'utilisation des betteraves tolérantes au glyphosate. In "Rapport de la commission du génie biomoléculaire et du comité provisoire de biovigilance sur l'analyse des bénéfices des OGM." Paris, 29 janvier 2002.
- 23 May M.J. (2003). Economic consequences for UK farmers of growing GM herbicide tolerant sugar beet. *Ann. Appl. Biol.* 142, 41-48.

# L'ENRICHISSEMENT EN VITAMINE A : CAS DU "RIZ DORE"

---

## 1 PLACE DU RIZ DANS L'ALIMENTATION

Le riz est consommé par la moitié de la population mondiale. Il est l'aliment de base dans au moins 33 pays en développement (15 d'Asie et du Pacifique, 10 d'Amérique latine et des Caraïbes, 8 d'Afrique) où il représente 27% des apports énergétiques, 20% des protéines et 3% des lipides fournis par l'alimentation. Il contient de la thiamine, de la riboflavine, de la niacine (vitamines du groupe B) et du zinc en quantités intéressantes du point de vue nutritionnel, mais peu ou pas de vitamines C et D et de bêta-carotène (FAO – Commission Internationale du Riz – juillet 2002).

La composition en nutriments du riz est fonction de nombreux facteurs : génotype (cultivar), pratiques culturales, conditions environnementales, temps et conditions de stockage, mode de préparation (décorticage, usinage, étuvage, cuisson). La quantité d'énergie fournie par le riz a augmenté de façon considérable en 40 ans (411 kcal/personne/jour en 1960, 577 actuellement).

La consommation journalière moyenne serait, selon des études réalisées en Chine et en Inde (FAO, 1998), de 300 grammes de riz cru par homme adulte et de 250 grammes par femme adulte.

La valeur nutritionnelle du riz peut être améliorée par la sélection végétale classique, mais quelques programmes spécifiques font maintenant appel à la transgénèse (augmentation des teneurs en bêta-carotène, ferritine ; obtention d'une phytase thermo-résistante). De plus, l'enrichissement direct du riz est également tenté, notamment pour le fer, mais cette méthode est délicate à mettre en œuvre et la difficulté dépend de l'élément à ajouter.

Une autre approche est de modifier les habitudes alimentaires en encourageant les populations à cultiver et à consommer des fruits et des légumes riches notamment en carotène, mais également de faire consommer du riz brun (complet) plutôt que du riz blanc. Cette dernière approche, apparemment simple, se trouve confrontée à des connotations socioculturelles profondément ancrées dans la population et prônant l'utilisation du riz blanc.

## 2 BESOINS ET CARENCES EN VITAMINE A

### 2.1 CONTEXTE GENERAL

On considère que les problèmes nutritionnels majeurs à l'échelon mondial et, en particulier, dans les pays en voie de développement, sont la malnutrition protéinoénergétique ainsi que les carences en fer, en iode, en zinc et en vitamine A. En ce qui concerne cette dernière, des millions de personnes manifestent des signes cliniques de carence en vitamine A [1]. Parmi les pays concernés, l'Asie du Sud présente la plus forte prévalence d'anémie et de carence en vitamine A [2]. Il s'agit là de pays forts consommateurs de riz.

La carence en vitamine A (VAD = Vitamine A Deficiency) est l'une des plus importantes quant à ses conséquences sur la santé et se manifeste généralement par des symptômes cliniques sévères. L'UNICEF estime que 124 millions d'enfants étaient concernés par cette carence à travers le monde en 1992 [3]. Ainsi, chaque année, 5 millions d'enfants développent, en Asie du Sud, une xérophtalmie et, à l'échelon mondial, 500 000 enfants deviennent aveugles de façon irréversible.

### 2.2 SOURCES DE VITAMINE A

Les produits d'origine animale sont sources de vitamine A (rétinol, rétinol, esters de rétinol) et ceux d'origine végétale contiennent du bêta-carotène ou provitamine A. De fait, l'organisme n'a besoin de caroténoïdes que pour les transformer potentiellement en rétinol actif. La disponibilité de ces derniers (libération de la molécule dans la lumière intestinale) est liée à la nature de la matrice où ils se trouvent (fibres, feuilles, ...) et à la composition des repas en lipides. En effet, l'utilisation des caroténoïdes est fortement associée à celle des lipides. Les caroténoïdes sont solubilisés et intégrés

dans les micelles lipidiques grâce à l'action des sels biliaires et de phospholipides : la forme solubilisée est la seule à permettre leur passage dans les entérocytes, site de leur bioconversion en rétinol ou de leur transfert dans les chylomicrons (complexe lipoprotéique assurant le transport des lipides dans l'organisme après leur absorption intestinale).

### 2.3 METABOLISME, BIOCONVERSION DE LA PROVITAMINE A EN VITAMINE A

La bioconversion des caroténoïdes en rétinol, forme active de la vitamine A, se fait partiellement dans les cellules intestinales au cours de l'absorption ou dans le foie, grâce à une enzyme de clivage, la bêta-carotène dioxygénase qui coupe le bêta-carotène en libérant du rétinol, lui-même réduit ensuite en rétinol par une réductase, fonctionnant avec du zinc comme cofacteur. Le rétinol peut aussi être oxydé en acide rétinoïque. La vitamine A circule dans le sang sous forme de rétinol associé à une protéine de transport spécifique, la RBP (Retinol Binding Protein).

La bioconversion de la provitamine A en vitamine A est extrêmement variable d'une espèce à l'autre ; on cite par exemple des taux de conversion de 100 % chez le poulet et de 10% chez le cheval. Chez l'homme, on admet généralement un facteur moyen de conversion de 6 - soit 6 microgrammes de bêta-carotène pour 1 microgramme de rétinol -. Il y a une assez grande variabilité interindividuelle, ainsi qu'entre l'homme et la femme [4]. Deux autres caroténoïdes sont également source de rétinol, l'alpha-carotène et la bêta-cryptoxanthine mais le facteur de conversion serait au moins 2 fois plus faible que celui du bêta-carotène. Différents organismes proposent, pour le bêta-carotène, les facteurs moyens de conversion suivants .

- a) x 12 (US Natl. Acad. Sci. Inst. Med. 2001) [5]
- b) x 6 (FAO/WHO,1988) [6]
- c) x 4 (Indian Council of Medical Research).

Bien que ce facteur de conversion ait été revu récemment à la hausse par l'US Institute of Medicine, Food and Nutrition [5], certains le considèrent encore en dessous de la réalité. Ils estiment que 21 µg de bêta-carotène sont nécessaires pour obtenir 1 µg de rétinol à partir d'un aliment complexe [28]. Ce point déterminant relatif à la biodisponibilité de la provitamine A à partir d'aliments et à ses facteurs de conversion a fait l'objet d'une revue récente de Li and Tso [29].

### 2.4 BIODISPONIBILITE

La biodisponibilité globale des caroténoïdes résulte donc de l'efficacité de la digestion et de leur absorption puis de leur conversion ultérieure en métabolites actifs.

La disponibilité des caroténoïdes dépend donc de leur origine, de leur nature et du contexte alimentaire de leur ingestion. Ainsi les carottes produiraient une provitamine A sous forme de cristal difficilement digestible en l'état, la cuisson et la consommation simultanée d'huile permettant son absorption [7]. L'absorption à partir de l'orange serait plus facile. L'absorption intestinale de la provitamine A dépend de nombreux facteurs et notamment de la présence concomitante de lipides au moment de l'ingestion. Selon de Benoist (WHO), les populations qui souffrent de carence ont souvent des régimes déficients en lipides, ce qui n'est pas favorable à un apport correct de vitamine A. Par ailleurs, des pathologies infectieuses ou des diarrhées peuvent singulièrement diminuer l'absorption du précurseur de vitamine A. Si la biodisponibilité de la vitamine A incorporée à du riz sous forme de palmitate à raison de 800 µg/g a fait l'objet d'une étude concluant à un effet positif chez 48 des 83 sujets traités [8], nous n'avons pas identifié d'étude de cette nature avec le riz doré.

### 2.5 STABILITE

La provitamine A, comme la vitamine A, est sensible à la chaleur, à la lumière et à l'oxydation. Une quantité jugée importante de provitamine A est perdue au cours du séchage et du stockage des végétaux. Ainsi, la quantité de provitamine A serait proche de zéro 6 mois après la récolte de certains végétaux. Selon Flores *et al* [8], un premix contenant 800 µg/g de vitamine A palmitate, conservé hors de la lumière directe, perdrait 25 % de sa teneur en 3 mois. La cuisson (5 min à l'eau bouillante et 25 min à l'eau tiède) conduit à une perte de 25,9 % ± 9,1 % (n = 70). Selon les conditions de

conservation, des aliments traditionnels thaïlandais perdent jusqu'à 40 % de leur teneur en provitamine A au-delà de 3 mois. Inversement, la fermentation de certaines préparations peut conduire à des augmentations du taux de bêta-carotène de l'ordre de 68 % après 2 mois et jusqu'à 1265 % après 12 mois [9].

## 2.6 BESOINS

Selon Azaïs-Braesco *et al* [10], les apports nutritionnels conseillés (ANC) varient de 350 ER<sup>11</sup> (Equivalents Rétinol) soit 1155 UI par jour chez le nourrisson à 950 ER soit 3125 UI par jour chez la femme allaitante. Chez un enfant de 1 à 3 ans, les apports conseillés sont de 450 ER soit 1320 UI ou 0,3 mg par jour. Les ANC de l'homme et de la femme adultes sont respectivement de 800 et 600 ER/jour.

## 2.7 CARENCE EN VITAMINE A

La carence en vitamine A a des conséquences sur l'œil, d'abord en ralentissant le rythme de régénération des pigments intervenant dans la vision, suite à une exposition à la lumière vive, ensuite en rompant progressivement l'intégrité de l'épithélium avec pour conséquence ultime, la cécité.

La vitamine A semble également intervenir au niveau du système immunitaire et sur l'intégrité du système cellulaire. L'acide rétinoïque, obtenu par oxydation du rétinol, joue un rôle important dans la régulation de l'expression du génome et sur la différenciation cellulaire. Ces effets combinés, en cas de carence, auraient pour conséquence la mort annuelle d'environ 1 à 3 millions d'enfants de moins de 5 ans [11].

## 2.8 HYPERVITAMINOSE A

L'hypervitaminose A est un processus pathologique lié à des concentrations excessives de rétinol ou d'acide rétinoïque libres [12]. Il en résulte deux types de toxicité :

- une **toxicité aiguë** à des doses massives supérieures à 1000 fois le besoin minimal. Les doses responsables de troubles sont de 1 à 2 millions d'unités de vitamine A chez l'adulte et 75 à 100 000 UI chez l'enfant [13,14]. Les symptômes observés chez l'homme, isolés ou simultanés, se traduisent par des maux de tête intenses, des nausées, des pertes d'appétit, accompagnés de troubles cutanés et du cuir chevelu, d'asthénie et d'hémorragies légères ;
- une **toxicité chronique** lors d'ingestion pendant des périodes prolongées de quantités de l'ordre de 100 à 1000 fois le besoin minimal recommandé. Chez l'adulte, l'intoxication chronique est exceptionnelle pour une consommation inférieure à 50 000 UI de vitamine A par jour et jusqu'à 100 000 UI/j. Chez l'enfant, et plus particulièrement chez le nourrisson, les troubles apparaissent lors d'apports plus faibles (de l'ordre de 2500 UI de vitamine A/kg de poids corporel). Les symptômes observés sont les mêmes que ceux d'une intoxication aiguë mais l'intensité peut en être variable. S'y ajoutent des troubles cutanés (atteintes des muqueuses, gingivites, etc.), des insomnies et des troubles du caractère ainsi que des douleurs osseuses et des troubles du métabolisme osseux. Des altérations hépatiques (hépatomégalie, fibrose) et des effets tératogènes surviennent dans les cas les plus graves.

Par ailleurs, le premier trimestre de la grossesse constitue une période critique en cas d'apports excessifs de vitamine A, avec des risques multiples de malformation du fœtus.

Ces données de toxicité ont conduit divers organismes à formuler des recommandations en matière d'apports limites. Ainsi, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a fixé en 1996 des valeurs seuils pour la vitamine A, au-delà desquelles existent des risques de toxicité :

- 50 000 UI en prise chronique,
- 1 à 2 millions d'UI en prise aiguë pour la population générale,

<sup>11</sup> 1 mg rétinol = 1000 ER (Equivalent Rétinol) = 3330 UI (Unités Internationales)

- 25000 UI en prise aiguë ou chronique chez la femme enceinte (dose minimale présentant un effet néfaste).

La limite de sécurité<sup>12</sup> fixée par le CSHPF en 1996 à 5500 UI a été récemment revue au niveau européen à la lumière des nouvelles études et fixée à 10.000 UI pour la population générale (y compris la femme en âge de procréer<sup>13</sup>).

### 3 STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LA CARENCE EN VITAMINE A

La réduction de la prévalence des différentes formes de carence en vitamine A a déjà fait l'objet dans le monde de nombreux programmes d'interventions et d'essais nutritionnels. Leur efficacité en est très variable selon les conditions expérimentales et les stratégies adoptées. Par ailleurs les causes de la carence en vitamine A sont très nombreuses et peuvent être regroupées sous quatre rubriques :

- apport insuffisant d'aliments sources de vitamine A : c'est en général le cas du rétinol contenu dans les produits animaux ;
- faible biodisponibilité : cela concerne plutôt les caroténoïdes d'origine végétale ;
- pratiques d'allaitement maternel inadéquates ;
- infections microbiennes et parasitaires.

Il faut enfin tenir compte des nombreuses interactions nutritionnelles qui sont susceptibles de moduler la biodisponibilité et la bioefficacité de la vitamine A [15]. Ainsi observe-t-on la coexistence des carences en vitamine A, fer et zinc. Ces nutriments sont impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, tel le zinc qui est un cofacteur de la rétinol-réductase. Les apports lipidiques et protéiques sont aussi des facteurs déterminants soit au niveau des mécanismes d'absorption intestinale (lipides), soit pour le contrôle des protéines de transport (complexe RBP-TTR-rétinol), de stockage, des récepteurs cellulaires et d'enzymes comme la bêta-carotène dioxygénase.

Les nombreux facteurs déterminants de la carence en vitamine A impliquent et justifient des stratégies différentes et complémentaires de lutte contre les effets des carences. Trois grandes approches sont envisageables :

- A la voie de la supplémentation médicamenteuse par des capsules de vitamine A ;
- B les approches alimentaires qui regroupent toutes les mesures et interventions impliquant l'alimentation. Il s'agit alors d'intervenir à trois niveaux :
  - la production d'aliments riches en vitamine A et l'adoption de conduites de transformation et de conservation appropriées, sachant que la vitamine A est sensible à l'oxydation et à la lumière ;
  - la diversification de l'alimentation ;
  - l'enrichissement d'aliments vecteurs par de la vitamine A.
- C des mesures de santé publique : promotion de l'allaitement maternel et lutte contre les affections et les parasitoses.

#### 3.1 SUPPLEMENTATION MEDICAMENTEUSE

Ces programmes impliquent la distribution de capsules de vitamine A aux enfants de 6 mois à 6 ans à des doses susceptibles de leur permettre de constituer des réserves hépatiques de vitamine A. Généralement, les campagnes de supplémentation sont couplées à des campagnes de vaccination, par exemple contre la poliomyélite. On peut donc atteindre un taux de couverture de 90 % des enfants, mais la distribution n'est possible qu'une fois par an, alors qu'il faudrait distribuer des

<sup>12</sup> La limite de sécurité<sup>13</sup> correspond à une dose pour laquelle il est raisonnable de penser que la probabilité d'observer un effet indésirable est la plus faible possible (pour ne pas dire nulle), en tenant compte des différences de sensibilité inter-individuelle.

<sup>13</sup> Evaluation des besoins nutritionnels des animaux en vitamines A, D et E ainsi que des risques pour la santé animale et la santé du consommateur, liés à des apports élevés chez les animaux producteurs d'aliments. Rapport AFSSA, Mars 2004. [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr).



capsules deux à trois fois par an. On peut se poser la question de l'efficacité du programme de supplémentation dans un contexte défavorable. Enfin lorsque les programmes de vaccination ont atteint leur objectif (éradication de la poliomyélite), sous quelle forme la supplémentation peut-elle se poursuivre ?

Beaton *et al* [16] estiment que les programmes de supplémentation peuvent réduire d'environ 25 % les cas de morbidité et de mortalité infantile dans les pays en développement. En revanche, Zagré [15] note que, malgré un programme de supplémentation mené au Burkina-Faso, la prévalence de la cécité crépusculaire chez des enfants de moins de 10 ans reste élevée.

### **3.2 LES APPROCHES ALIMENTAIRES**

Les approches alimentaires – enrichissement et diversification – sont généralement considérées comme les seules à être efficaces à long terme et dans des contextes différents : diversité des groupes d'âge, des zones géographiques. Les succès déjà enregistrés plaident en faveur de ces stratégies [15,17,18]. Cependant ces aliments enrichis ont généralement été distribués gratuitement dans des contextes expérimentaux, ce qui limite l'impact en terme de faisabilité. Seul Zagré [15] a procédé avec succès à un essai de mise sur le marché, en condition réelle d'achat et de libre consommation, d'huile de palme rouge.

#### **3.2.1 L'enrichissement d'aliments en vitamine A**

Plusieurs protocoles et approches sont possibles

##### ***Enrichissement par de la vitamine A***

Il s'agit la plupart du temps d'introduire la vitamine A dans un aliment vecteur, sous une forme spécifique (esters de rétinol, bêta-carotène) à une dose d'enrichissement qui dépendra de la consommation estimée de cet aliment. Les aliments-vecteurs doivent être socio-économiquement acceptables et régulièrement consommés par la majorité de la population ou plus spécifiquement par les groupes cibles. Cette technique a deux avantages : non-dépendance par rapport aux habitudes alimentaires, puisque l'aliment vecteur fait partie du modèle alimentaire habituel et absence de risque de surdosage par rapport à la supplémentation médicamenteuse, si la dose d'enrichissement est bien calculée. Une contrainte est liée à l'aspect technologique : le procédé d'enrichissement doit être maîtrisable et rigoureusement contrôlable, ce qui suppose que l'opération d'enrichissement ne peut se faire que dans un nombre limité d'unités industrielles de production.

Les expériences d'enrichissement d'aliments par de la vitamine A ont eu lieu essentiellement dans les pays latino-américains et asiatiques : elles ont porté sur du sucre, de l'huile, du blé, du riz, du thé, du glutamate [19]. Une expérience récente menée aux Philippines montre une amélioration du statut vitaminique chez des enfants recevant du blé enrichi en vitamine A [20].

##### ***Amélioration génétique***

On peut citer des programmes d'amélioration génétique par des voies classiques (carottes à haute teneur en bêta-carotène en Inde, patates douces enrichies au Mozambique, au Pérou) ou par génie génétique (riz doré).

##### ***Enrichissement d'aliment à aliment***

Une dernière approche consiste à associer à un aliment-vecteur classique un ingrédient particulièrement riche en vitamine A. Ce fut le cas en Tanzanie où de la farine de manioc a été enrichie avec de l'huile de palme rouge [21]. Un autre essai réalisé au Viet-Nam [22] montre que l'association du riz à un fruit particulièrement riche en bêta-carotène (le gac) permet d'améliorer la rétinoémie chez l'enfant, alors que du riz directement enrichi en bêta-carotène ne donne pas les effets escomptés. Enfin Garcia-Casal *et al* [23] montrent que l'enrichissement de céréales (riz, blé, maïs) en vitamine A améliore l'absorption du fer non-héminique.

#### **3.2.2 La diversification alimentaire**

Il s'agit dans ce cas de jouer sur la diversité des sources de vitamine A, en distinguant :

- les **produits animaux**, riches en rétinol, dont la biodisponibilité est bonne : beurre, fromage, œufs, lait entier, poissons gras. Il faut noter que certains de ces produits sont peu accessibles économiquement, surtout dans les pays en développement ;
- les **produits végétaux** : légumes (carottes, épinards, brocolis, poireaux) et fruits à chair jaune ou orangée (melon, mangue, abricot, papaye). Il faut mentionner spécialement l'huile de palme rouge non raffinée. Un inventaire récent des sources végétales de caroténoïdes a été réalisé par une équipe de l'IRD-Montpellier : il montre les très grandes potentialités de plantes cultivées et surtout sauvages des régions sahéliennes et qui mériteraient d'être exploitées et valorisées [24].

Dans les végétaux, la vitamine A se trouve sous forme de caroténoïdes dont la biodisponibilité est moyenne : elle est plus faible dans les feuilles vertes (carotène associé aux chloroplastes) que dans les fruits jaunes (carotène associé à des chromoplastes). La biodisponibilité relativement faible des caroténoïdes végétaux est cependant compensée par la grande diversité des sources.

La diversification alimentaire consiste à jouer sur les plans suivants :

- promouvoir
  - \* la production d'aliments riches en vitamine A,
  - \* l'accès à ces aliments,
 leur consommation par des interventions de type éducatif,
- améliorer la transformation et la conservation des produits en réduisant les pertes (par oxydation ou par les UV ),
- améliorer la biodisponibilité en augmentant par exemple la consommation de lipides associés, si nécessaire.

Les programmes réalisés, peu nombreux, associent à la promotion d'aliments diversifiés et riches en vitamine A des interventions nutritionnelles éducatives ou la mise en place de jardins familiaux ou villageois. Ces programmes, pour être évalués, supposent l'existence de systèmes de surveillance nutritionnelle. On peut citer quelques expériences menées ces dernières années au Kenya, en Thaïlande, en Inde. Il faut enfin évoquer le travail mené par Zagré au Burkina-Faso qui a réalisé une étude longitudinale sur deux ans, consistant à introduire l'huile de palme rouge dans une région n'en consommant pas classiquement. L'originalité de la démarche a été d'introduire l'huile de palme rouge sur une base commerciale dans un contexte d'achat et de consommation libre et volontaire. Les résultats obtenus – augmentation de la consommation de vitamine A, amélioration de la rétinoïdémie chez les enfants et les mères – attestent de la faisabilité et de l'efficacité de cette approche [25,15].

Ces différentes démarches alimentaires par enrichissement ou par diversification montrent aussi, au-delà du contexte lié à l'état nutritionnel des groupes visés et à l'état sanitaire, que le rôle des facteurs économiques et socioculturels est capital.

#### **4 OBTENTION D'UN RIZ ENRICHÉ EN PROVITAMINE A PAR VOIE BIOTECHNOLOGIQUE : LE RIZ DORE [26]**

L'endosperme du grain de riz immature est capable de synthétiser le géranylgeranyl diphosphate qui peut ensuite être transformé en phytoène ("carotène incolore") en présence de phytoène synthétase non présente initialement. Mais l'obtention de bêta-carotène nécessite l'action complémentaire de 3 autres enzymes : la phytoène désaturase, la bêta-carotène désaturase (chacune intervenant dans la formation de deux doubles liaisons) et la lycopène bêta-cyclase. La difficulté d'introduction des 4 gènes gouvernant la synthèse de ces 4 enzymes peut être réduite en utilisant une désaturase d'origine bactérienne qui, à elle seule, permet de réaliser les 4 doubles liaisons nécessaires.

Le protocole suivi par les auteurs sera présenté ici de façon schématique. Il est basé sur l'utilisation d'embryons immatures de riz et d'*Agrobacterium* pour introduire en une seule opération de transgénèse les gènes concernés. Le vecteur pB19hpc inclut les séquences de la phytoène synthétase (issues du dahlia, *Narcissus pseudonarcissus*) et celles de la phytoène désaturase (issues de la bactérie *Erwinia uredovora*) ; elles permettront la formation de lycopène dans les plastides de l'endosperme, là où est synthétisé le géranylgeranyl diphosphate. Deux autres vecteurs sont utilisés :

pZPsC, qui porte les mêmes gènes que le plasmide pB19hpc, et pZLcyH, qui inclut le gène codant pour la lycopène  $\beta$  cyclase (séquence issue du dahlia).

Suite à de nouvelles expériences, Beyer et al [27] montrent que la transgénèse peut apporter d'aussi bons résultats que ceux obtenus avec le protocole précédemment décrit, sans co-transformation, c'est-à-dire en utilisant une seule construction n'incluant que la phytoène synthétase et la phytoène désaturase. D'autres modifications du protocole sont en cours d'étude.

La quantité de bêta-carotène produite par grain est actuellement de l'ordre de 1,6 à 2,0  $\mu\text{g/g}$ . Si l'on se réfère au taux de conversion le plus faible précédemment mentionné (12  $\mu\text{g}$  de bêta-carotène pour obtenir 1  $\mu\text{g}$  de rétinol) et aux apports journaliers recommandés (400 à 500  $\mu\text{g}$  de rétinol pour les enfants), cela aboutit à une consommation journalière d'environ 2,5 kg de riz doré tel que produit actuellement. De plus, il est clair que le riz produit au champ ne présentera peut être plus la même capacité de production (mais des expériences sont en cours pour introduire la même construction dans des variétés locales de riz). Cependant, il faut être conscient que le riz doré ne prétend pas, à lui seul, subvenir à tous les besoins en provitamine A, et que, même s'il ne permet de pallier que partiellement la carence actuelle, il aura atteint un objectif très intéressant.

## 5 EFFICACITE DU RIZ DORE

Comme la plupart des céréales, le riz "brun" entier ne contient que de faibles quantités de provitamine A (0,1  $\mu\text{g}$  d'équivalent bêta-carotène par gramme) alors que le riz "blanc" décortiqué n'en contient pas.

C'est la très large consommation de cet aliment dans le monde, notamment chez les populations les plus pauvres, qui a conduit les "inventeurs" du riz doré à le proposer comme support d'une complémentation du régime. Compte-tenu de la pratique du décorticage, l'expression de la provitamine A a été ciblée dans l'endocarpe.

Sur la base d'une teneur en provitamine A estimée entre 0,16 et 0,20 mg/100 g de riz doré, d'une biodisponibilité du précurseur de 100 % (hypothèse haute) ou de 50 % (hypothèse basse) et en considérant que l'apport recommandé chez l'enfant est de 0,3 mg/jour, les facteurs de conversion de la provitamine A en vitamine A selon les organismes (cf point 2.3) : x12, x6 ou x4 ont conduit Beyer et Potrykus aux conclusions suivantes quant à la consommation de "riz doré" nécessaire pour couvrir la totalité des besoins en vitamine A (1<sup>ère</sup> estimation) :

<b>1<sup>ère</sup> estimation</b>	Consommation de "riz doré" en g/jour	
Facteur de conversion selon les organismes	Disponibilité du précurseur : 100%	Disponibilité du précurseur : 50 %
X12	1800 à 2250	3600 à 4500
X6	900 à 1125	1800 à 2250
X4	600 à 750	1200 à 1500

En considérant que l'apport de la dose recommandée est un objectif idéaliste, mais que 30 à 40 % seraient suffisants pour réduire la mortalité, la morbidité et les troubles de la vue, les consommations quotidiennes seraient ramenées (2<sup>ème</sup> estimation) à :

<b>2<sup>ème</sup> estimation</b>	Consommation de "riz doré" en g/jour	
Facteur de conversion selon les organismes	Disponibilité du précurseur : 100%	Disponibilité du précurseur : 50 %
X12	540 à 675	1080 à 1350
X6	270 à 337	ou 540 à 674
X4	180 à 225	360 à 450

En considérant encore que l'apport de 100% de ces besoins **par le seul "riz doré"** est un objectif maximaliste mais que 50 % seraient un bon objectif, les autres 50 % étant apportés par d'autres sources, les consommations quotidiennes de "riz doré" seraient ainsi réduites à (3<sup>ème</sup> estimation) :

<b>3<sup>ème</sup> estimation</b>	Consommation de "riz doré" en g/jour	
Facteur de conversion selon les organismes	Disponibilité du précurseur : 100%	Disponibilité du précurseur : 50 %
X12	270 à 337	540 à 674
X6	135 à 168	270 à 336
X4	90 à 112	180 à 224

Mais les auteurs estiment encore que le projet est toujours à l'état de "proof of concept" et que des améliorations de la variété actuelle peuvent conduire à augmenter d'un facteur 3 à 5 la production de provitamine A conduisant aux estimations suivantes (4<sup>ème</sup> estimation) :

<b>4<sup>ème</sup> estimation</b>	Consommation de "riz doré" en g/jour	
Facteur de conversion selon les organismes	Disponibilité du précurseur : 100%	Disponibilité du précurseur : 50 %
X12	90 à 112	180 à 224
X6	45 à 56	90 à 112
X4	30 à 38	60 à 76

Ainsi, les auteurs estiment qu'une consommation quotidienne de riz doré (nouvelle variété) de 30 à 224 g pourrait réduire significativement les carences et leurs conséquences, estimation que ne partagent pas certaines ONG qui parlent de plusieurs kilogrammes nécessaires à un apport suffisant.

En conclusion, tout le monde s'accorde à considérer qu'il existe un vrai problème de carences vitaminiques dans certains pays et, notamment, de carence en vitamine A. Il semble également que beaucoup considèrent que la réponse à apporter est pluridirectionnelle, le riz doré pouvant être un élément de cette stratégie.

Nous avons vu précédemment que divers problèmes de biodisponibilité et de stabilité de la provitamine A existaient, sans qu'il n'y ait, à notre connaissance, d'études éclairant ces différents aspects à partir du riz doré. Certes, Potrykus estime que le bêta-carotène est stocké dans des membranes lipidiques et qu'il est en conséquence fortement biodisponible avec, par ailleurs, un facteur de conversion de 2. Il conviendrait de disposer de travaux démontrant ces assertions, la situation nutritionnelle et sanitaire des populations ciblées devant également être prise en compte. La capacité de cette variété à être cultivée et associée aux autres variétés de riz indispensables dans la tradition des pays concernés est également un facteur à intégrer pour lequel nous n'avons semble-t-il pas d'éléments. Dans la démarche de consommation quotidienne précédemment rapportée, Potrykus prend déjà en compte une nouvelle variété de riz doré, ce qui confirme la situation actuelle de cette proposition, une "proof of concept" mais qui intègre essentiellement des éléments de recherche et oublie quelque peu les éléments de terrain.... Des questions évoquées lors de la présentation de Potrykus aux journées de l'AFSSA sont, semble-t-il, toujours sans réelle réponse :

- digestibilité de la protéine de stockage ?
- essais de transfert aux Philippines, Malaisie, Vietnam, Chine....?
- essais cliniques réalisés ?

Il manque des pièces importantes du puzzle, pour considérer, à l'heure actuelle, la proposition comme totalement convaincante et adaptée à la problématique sous ses multiples aspects.

## 6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'aventure du riz doré ne fait que commencer et elle a pourtant déjà fait couler beaucoup d'encre. Il est vrai que le projet est ambitieux à plus d'un titre. C'est en effet le premier cas où un projet a pour seul but d'améliorer la santé de groupes humains qui souffrent gravement de carences alimentaires. L'obtention d'un riz contenant des quantités utiles de vitamine A ne va pas de soi. L'implantation des variétés de riz contenant de la vitamine A n'est simple ni du point de vue technique, agronomique, médical et social ni en ce qui concerne les droits de propriété industrielle.

Le premier succès qui est incontestable est que trois gènes suffisent pour que l'on retrouve des quantités substantielles de vitamine A dans la graine de riz qui n'en contient pas naturellement. Force est de constater cependant que les semences de riz doré existantes n'en sont pas véritablement au stade de prototype et que l'étape franchie n'a pas permis d'aller au-delà de la preuve du concept qui, il est vrai, est un point essentiel. Il reste à évaluer le comportement du riz dans les conditions agronomiques réelles. L'augmentation de 3 – 5 fois de la concentration de vitamine A dans le riz doré qui est hautement souhaitable n'est pas encore assurée. L'efficacité de la conversion de provitamine A du riz doré en vitamine A active paraît encore mal connue et les expériences basées sur l'utilisation de modèles animaux n'ont pas été publiées si elles ont été réalisées. Le succès rapide de la première partie du projet se heurte donc maintenant aux problèmes de la nutrition humaine qui sont encore plus complexes.

La transposition rapide du procédé à des variétés locales a été souhaitée par les auteurs du projet et elle est en cours. On doit cependant noter que deux variétés de riz, largement utilisées en Asie, ont été récemment génétiquement modifiées de manière à produire des quantités substantielles de vitamine A [30]. Les Philippines ont par ailleurs lancé un programme pour le développement de la culture du riz doré [31]. Des centaines de variétés sont exploitées pour leur adaptation aux conditions agronomiques locales ou au goût des consommateurs. Le nombre de variétés qui pourraient être enrichies en vitamine A ne peut être en pratique que très limité. En cas de succès, la consommation du riz doré pourrait progressivement accélérer l'abandon de variétés locales qui représentent une précieuse biodiversité.

L'acceptabilité du riz doré par les consommateurs ne va pas de soi. La couleur du riz doré et l'inconnue que représente cette nouveauté peut se traduire par des refus de certaines communautés qui auraient pourtant tout intérêt à adopter ces nouvelles variétés.

Les droits de propriétés industrielles sont un des points clef de l'aventure. Les auteurs du projet ont pu obtenir des licences gratuitement pour les 72 brevets détenus par 30 entreprises. Encore faut-il s'assurer du fait que la liberté d'agir est acquise effectivement et que les agriculteurs auront bien le droit de cultiver le riz doré. Les différents acteurs, les chercheurs et les instances qui soutiennent le projet ont quant à eux prévu de donner les semences gratuitement aux agriculteurs. L'entreprise Monsanto qui a développé des variétés de moutarde et de colza enrichis en vitamine A proposent de renoncer à ses droits pour les agriculteurs nécessiteux à condition que ceux-ci ne vendent pas leurs produits à un niveau dépassant 10 000 dollars par an et par agriculteur.

Au-delà de toutes ces considérations, il est important d'évaluer le bien-fondé de la démarche qui a conduit à l'existence du riz doré.

Il est peu contestable que le projet est destiné à améliorer la santé de groupes humains nécessiteux et qu'il est conduit de manière à être aussi indépendant que possible des entreprises privées. Les succès des premières étapes ont probablement soulevé un enthousiasme excessif chez certains et notamment les principaux acteurs du projet. Il ne s'agit pour autant pas là de fausses promesses mais bien de vrais espoirs.

Il apparaît que le riz doré n'est pas la solution pour supprimer les carences en vitamine A car aucune solution ne saurait résoudre le problème à elle toute seule. Un des points forts du projet est, en principe au moins, qu'un apport substantiel de vitamine A serait obtenu sans que les populations concernées ne soient obligées de modifier leurs habitudes agronomiques et alimentaires.

Il apparaît également que les autres solutions (utilisation d'autres plantes locales naturellement riches en vitamine A, imprégnation du riz par de la vitamine A de synthèse avant sa mise sur le marché) n'ont fait l'objet ni d'une étude ni d'un financement à la hauteur des espoirs qu'elles soulèvent. Il

convient toutefois en ces matières d'éviter tout jugement simplificateur. Il est probable que l'urbanisation rapide et massive s'est accompagnée d'un abandon de la culture et de la consommation de plantes riches en micronutriments. Les carences alimentaires ne sont pas pour autant pas nouvelles. Il serait en tout cas préjudiciable d'opposer le développement de la culture de plantes traditionnelles ou l'addition de vitamine A de synthèse à l'exploitation du riz doré. Il y a trop d'incertitudes dans ces différentes approches pour que l'on prenne raisonnablement le risque de favoriser l'une au dépend de l'autre. L'importance du problème et l'urgence qu'il y a à trouver des solutions satisfaisantes ne laissent pas beaucoup de choix.

Rien n'indique que la démarche qui a conduit à l'obtention des premières variétés de riz doré se dirige vers un échec. Elle doit donc pouvoir être poursuivie dans la sérénité avec les encouragements critiques de l'opinion publique.

## Références bibliographiques

- 1 United Nations ACC/SCN. Fourth report on World Nutrition Situation. (2000) UN ACC/SCN in collaboration with IFPRI, Geneva, 2000, 132pp. [www.ifpri.org](http://www.ifpri.org)
- 2 Mason J., Hunt J., Parker D. Jonsson U. (1999) Investing in child nutrition in Asia. *Asian Development Review* 17(1,2).
- 3 Humphrey J.H., West K.P., Sommer A. (1992) Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. *Bull World Health Organ* 70. : 225-232.
- 4 Hickenbottom, S. J, Follett, J. R, Lin, Y., Dueker, S. R, Burri, B. J, Neidlinger, T. R, Clifford, A. J (2002). Variability in conversion of {beta}-carotene to vitamin A in men as measured by using a double-tracer study design. *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 900-907
- 5 US Natl. Acad. Sci. Inst. of Medicine (IOM), January 9, 2001. In Beyer P. Tables on provitamin A amount, Forum US AgBioView, 2001.
- 6 FAO/WHO Expert Consultation (1988) Requirements of Vitamin A, Iron, Folate, and Vitamin B12. Food and Nutrition Series no. 23, FAO, Rome The latest international report to consider requirements for vitamin A.
- 7 Koechlin, F. (2000) The "golden rice" - a big illusion? *Third World Resurgence* #114/115, 33-35.
- 8 Flores H., Guerra N.B., Cavalcanti A.C.A., Campos F.A.C.S., Azevedo M.C.N.A., Silva M.B.M. (1994). Bioavailability of Vitamin A in a synthetic Rice Premix. *J. Food Sci.*, 59, 2, 371-372 and 377.
- 9 Chavasit V., Pisaphab R., Sungpuag P., Jittinandana S., Watsantwisut E. (2002) Changes in Beta-carotene and vitamin A contents of vitamin A-rich food in Thailand during preservation and storage. *J. Food Sci.*, 67, 1, 375-379.
- 10 Azaïs-Braesco V. et Grolier P. (2001) Vitamines liposolubles, vitamine A et caroténoïdes provitaminiques. In " Apports nutritionnels conseillés pour la population française ". 3<sup>e</sup> éd Tec & Doc. Martin A. coord. 221-228.
- 11 Underwood B.A. (1998) Vitamin A deficiency. *Bull World Health Organ.* 76 Suppl 2:124-5.
- 12 Smith F.R. and Goodman D.W. (1976). Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. *N. Engl. J. Med.* 294, 805-808.
- 13 Omaye F. (1984) Safety of megavitamin therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 117: 169 -203.
- 14 Azaïs-Braesco V., (1993) Hypervitaminose A et tératogenèse, incidence et mécanismes. *Cah. Nutr. Diet.*, XXVIII, 28 : 143-150.
- 15 Zagré N. (2002) Projet-pilote d'introduction de l'huile de palme non raffinée comme source de vitamine A au Burkina-Faso. Evaluation de l'impact. Thèse Université Montpellier 2 et PhD Université de Montréal (septembre 2002).
- 16 Beaton G.H. , Martorell R. , Aronson K.J. (1993) Effectiveness of vitamin A supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries. ACC/SCN State-of-the-art Series, Nutrition Policies Discussions, paper n°13, Genève, Nations-Unies, ACC/SCN, 120
- 17 De Pée S., Bloem M.W., Kiess L. (2000) Evaluating food-based programmes for their reduction of VAD and its consequences. *Food Nutr. Bull.* 21
- 18 Gibson R.S., Hotz C., Temple L. (2000) Dietary strategies to combat deficiencies in iron, zinc and vitamin A in developing countries. Development, implementation, monitoring and evaluation. *Food Nutr. Bull.* 21, 219-231
- 19 Darnton-Hill I., Mora J.O., Weinstein H., Wilbur S., Nalubola P.R. (1999) Iron and Folate Fortification in the Americas to Prevent and Control Micronutrient Malnutrition: An Analysis. *Nutrition Reviews*®, Vol. 57, No. 1.
- 20 Solon F.S., Klemm R.D., Sanchez L., Darnton-Hill I., Craft N.E., Christian P., West K.P. Jr. (2000) Efficacy of a vitamin A-fortified wheat-floor bun on the vitamin A status of Filipino schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 738-744
- 21 Mosha T.C., Laswai H.S., Mtebe K. (1999) Control of vitamin A deficiency disorders through fortification of cassava flour with red palm oil: a case study of Kigoma district, Tanzania. *Ecol. Food Nutr.* 569-593

- 22 Le Vuong T., Dueker S.R., Murphy S.P. (2002) Plasma beta-carotene and retinol concentrations of children increase after a 30-d supplementation with the fruit *Momordica cochinchinensis* (gac). *Am. J. Clin.Nutr.* 75, 872-879
- 23 Garcia-Casal M.N. (1998). Vitamin A and beta-carotene can improve non-heme absorption from rice, wheat and corn by humans. *J.Nutr.* 128, 648-650.
- 24 Mathieu-Daude C., Chevalier P., Barrot L. (2001) Produits végétaux riches en carotènes. CD-Rom IRD-OMS Ed. WHO/NHD/01.6, AFR/NHD 01.01
- 25 Delisle H., Zagré N., Ouedraogo V. (2001) Marketing of red palm oil as a source of vitamin A in Burkina-Faso : a pilot project involving women's groups. *Food Nutr. Bull.* 22, 4, 388-394
- 26 Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000) Engineering provitamin A (bêta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305
- 27 Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Potrykus I. (2002) Golden rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 506S-510S
- 28 West C.E., Eilander A., Van Liesshout M. (2002) Consequences of revised estimates of carotenoid bioefficacy for dietary control of vitamin A deficiency in developing countries. *J. Nutr.*, 132:2920S-2962S.
- 29 Li E., Tso P. (2003) Vitamin A uptake from foods. *Curr. Opin. Lipidol.*, 14: 241-247.
- 30 Hoa T.T.C., Al-Babili, Schaub P., Potrykus I., Beyer P. (2003) Golden Indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology*, 133, 161-169.
- 31 Chong M. (2003) Acceptance of golden rice in the Philippines "rice bowl". *Nature Biotechnology*, 21, 971-972.



# **ANALYSE PROSPECTIVE DES EVENTUELS EFFETS BENEFIQUES DE MICROORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES (MGM) : BACTERIES ET LEVURES**

---

Le champ de cette analyse prospective concerne des Microorganismes Génétiquement Modifiés (MGM) vivants qui feront partie des préparations pharmaceutiques, qui seront ingérées avec l'aliment ou la boisson ou utilisés dans divers procédés de bio-dépollution. Ils pourront avoir une visée médicale, nutritionnelle ou environnementale. De telles souches ne sont pas encore disponibles sur le marché (sauf une exception en Russie), mais elles pourraient faire l'objet de demande d'autorisation si les réticences "anti-OGM" étaient levées, au moins partiellement, et si elles représentaient un réel bénéfice pour le consommateur.

Le but de ce texte est de faire une courte revue de ce qui pourrait émerger prochainement et des éventuels bénéfices qui en découleraient. Comme toute étude prospective, elle comporte une part d'incertitude mais nous revendiquons ce droit à l'erreur.

## **1 LE POINT SUR LA CONSOMMATION ACTUELLE DE MICROORGANISMES VIVANTS NON MGM**

Nous ingérons chaque jour un grand nombre de bactéries vivantes. Parfois celles-ci font partie des flores saprophytes ou fortuites de nos aliments, comme celles présentes dans les légumes ou les fruits frais ou même dans certaines eaux embouteillées. Le nombre de germes opportunistes est cependant réduit pour des produits de qualité. Pour d'autres aliments, les bactéries sont introduites volontairement par l'homme et interviennent dans la transformation du produit. C'est le cas de certaines salaisons dont le saucisson, les fromages et les laits fermentés. Les plus importantes consommations bactériennes proviennent des yaourts et des laits fermentés puisque le nombre de bactéries est de l'ordre de  $10^8$  bactéries/gramme et que la consommation journalière de ces produits laitiers dépasse souvent les 200 g.

Depuis plus d'une dizaine d'années, de nouvelles espèces de bactéries ont été introduites dans ces produits. Elles en modifient le goût ou la texture mais surtout elles sont choisies pour induire des effets bénéfiques sur la santé humaine. On les appelle des probiotiques, c'est-à-dire des microorganismes vivants (le plus souvent des bactéries) qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels. A l'exception d'une levure probiotique [1] ayant un rôle de médicament (*Saccharomyces boulardii*), les probiotiques sont principalement des bactéries lactiques (BL), c'est-à-dire qu'ils fermentent les glucides en produisant de l'acide lactique, ou occasionnellement des *Bacillus*. Il existe de nombreuses revues concernant les effets bénéfiques sur la santé humaine des BL probiotiques. Nous citons ici les plus récentes [2-6] et invitons à la lecture instructive d'un numéro du British Journal of Nutrition (Vol 88, Supplément 1, 2002) consacré aux "probiotiques et à la santé". Les principaux effets positifs concernent principalement la régulation du transit (réduction des diarrhées et de la constipation), une stimulation de marqueurs de l'immunité qui suggère un effet positif sur le système immunitaire. Des travaux récents suggèrent un effet sur un type d'allergie (eczéma atopique de l'enfant) et une réduction de réponses inflammatoires digestives. Le rééquilibrage de la flore est souvent invoqué mais il ne s'agit le plus souvent que de la détection dans les selles du probiotique ingéré pendant la consommation du produit.

Une voie est donc ouverte pour des microorganismes génétiquement modifiés (MGM) ayant acquis de nouvelles propriétés et consommés vivants dans les produits. Ils pourraient exercer un rôle de médicament mais aussi modifier les propriétés organoleptiques de certains aliments ou changer des procédés industriels.

## 2 UTILISATION ACTUELLE DES MICROORGANISMES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

A partir des années 80, les MGM cultivés dans des conditions de confinement maîtrisées, sont utilisés en tant qu'organismes producteurs de molécules d'intérêt thérapeutique en médecine tel que des hormones (ex: insuline, l'hormone de croissance humaine) ou vaccins (le vaccin de l'hépatite B fabriqué par la levure *Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que dans le cadre de production d'enzymes, d'arômes et d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine ou animale. Les MGM sont ainsi utilisés comme des micro-usines métaboliques, puis les substances produites purifiées et commercialisées. C'est le cas par exemple, de la chymosine, enzyme utilisée dans l'industrie fromagère, qui peut être produite par des souches génétiquement modifiées d'*Escherichia coli*, *Aspergillus Niger* et *Kluyveromyces lactis* ou encore d'amylases de *Bacillus* sp. utilisées dans la panification ou l'industrie brassicole.

Les MGM pourraient aussi à l'avenir être présents directement, et non plus indirectement comme c'est déjà le cas avec la production d'enzymes par exemple, dans la fabrication de certains aliments. En effet, ces 10 dernières années, un ensemble de travaux a permis d'accroître de façon importante les outils pour obtenir des constructions génétiques dans les MGM. Aucun MGM n'est actuellement autorisé à la commercialisation pour être utilisé en tant que tel dans l'alimentation humaine. Par contre, une bactérie et deux virus génétiquement modifiées à des fins non alimentaires sont autorisés. Il s'agit d'une bactérie qui constitue la base d'un "kit" de détection de résidus d'antibiotiques dans le lait et de deux vaccins vétérinaires (un contre la rage et un contre la maladie d'Aujeszky du porc).

Différents MGM sont actuellement considérés, au moins par leurs constructeurs, comme prêts à être utilisés en technologie alimentaire. Parmi les projets les plus aboutis, on notera ceux concernant la bactérie lactique *Lactococcus lactis*, dont certaines souches ont été génétiquement modifiées pour permettre une accélération de l'affinage des fromages ou une meilleure résistance à certains virus qui lui sont spécifiques [7]<sup>14</sup> ; d'autres projets concernent la construction de levures génétiquement modifiées pour optimiser la fabrication du vin ou du pain.

Un nouveau domaine d'utilisation des MGM semble émerger : le MGM vivant qui pourrait remplacer le principe actif (médicament, enzyme, effet probiotique autre) et serait consommé par l'homme *via* des préparations alimentaires. Cette nouvelle approche permettrait potentiellement d'utiliser un MGM pour délivrer un médicament dans les parties basses du tractus digestif sans avoir recours à des formes galéniques plus sophistiquées.

Il est important de remarquer que les concepteurs de ces nouvelles souches de microorganismes font une distinction entre MGM transgénique, c'est à dire porteur d'un ou plusieurs gènes ou structures génétiques issus d'un organisme différent de celui qui est modifié, et MGM non transgénique, construit par autoclonage (SAGE : Sans Addition de Gène Extérieur) et donc n'étant pas soumis à la même réglementation.

## 3 VERS LES BACTÉRIES "MÉDICAMENT"

Un premier domaine concerne la vaccination orale, parentérale ou nasale. L'expression d'antigènes viraux ou tumoraux, d'anticorps neutralisants ou la production concomitante de différentes interleukines et d'antigènes semble moduler la réaction immunitaire de façon intéressante. Dans le cas d'allergies alimentaires, une désensibilisation orale à partir de MGM produisant un allergène modifié pourrait être envisagée.

Un deuxième domaine concerne la sécrétion dans le tractus digestif par le MGM ingéré d'enzymes ou de médiateurs pouvant jouer un rôle bénéfique (préventif ou curatif) sur la santé humaine. L'exemple le plus marquant, à l'heure actuelle, est celui de l'équipe de Steidler [8] qui concerne la production d'interleukine 10 par *Lactococcus lactis* dans le tractus digestif. Il a été possible par ce procédé de réduire une inflammation digestive expérimentale et ce type d'approche est actuellement testée chez des patients atteints de la maladie de Crohn.

<sup>14</sup> <http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM>).

Il a aussi été montré, sur modèle animal, que le relargage d'une lipase par un *Lactococcus lactis* pouvait améliorer la digestibilité des lipides chez des animaux à qui on a ligaturé le canal pancréatique pour mimer une déficience en lipase.

Toutes ces approches nécessitent une consommation de bactéries vivantes, certaines exprimant des protéines d'eucaryote. Des études bénéfice/risque doivent être mises en place.

Les tableaux 1 et 2 présentent un tour d'horizon des applications possibles dans le domaine médical des MGM vivants.

**Tableau 1** : Liste des protéines hétérologues produites par des bactéries lactiques (sauf *Lactococcus lactis*) et susceptibles de donner lieu à des applications médicales ou technologiques

Organisme producteur	Molécule	Objectif	Références
<i>Streptococcus gordonii</i>	Anticorps (H6) simple chaîne microbicide	Vaginite à <i>Candida albicans</i>	[32]
<i>Streptococcus gordonii</i>	Anticorps recombinant simple chaîne anti-idiotypique simulant le polysaccharide capsulaire de type III des streptocoques du groupe B	Protection passive contre les infections néonatales à streptocoques du groupe B	[33]
<i>Streptococcus gordonii</i> et <i>Lactococcus casei</i>	Protéine E7 du papilloma virus humain	Immunisation contre le papillomavirus	[42,57]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Toxine cholérique B	Protection contre le choléra	[65]
<i>Bacillus subtilis</i>	Ure B (sous-unité de l'uréase de <i>Helicobacter pilori</i> )	Protection contre <i>Helicobacter pilori</i>	[71]
<i>Bacillus subtilis</i>	Interféron alpha-2 humain	Protection anti-virale	[68,31]
<i>Bacillus subtilis</i>	Fragment C de la toxine tétanique	Protection contre <i>Clostridium tetani</i>	[43,56]

**Tableau 2** : Liste des protéines hétérologues produites par *Lactococcus lactis* et susceptibles de donner lieu à des applications médicales ou technologiques

Protéines	Gène	Origine	Mode de production	Références
<b>Antigènes bactériens</b>				
L7/L12	L7/L12	<i>Brucella abortus</i>	Sécrété/Ancré/Cytoplasmique	[62]
TTFC	ttfc	<i>Clostridium tetani</i>	Sécrété	[74]
<b>Antigènes viraux</b>				
E7	E7	Papilloma virus humain type16	Sécrété	[34]
NSP4	NSP4	Coronavirus bovin	Cytoplasmique	[44]
BCV epitope	BCV	Coronavirus bovin	Sécrété	[49]
Sous-unité B de l'urease		<i>Helicobacter pilori</i>	Sécrété	[53]
<b>Interleukines</b>				
IL-2	IL-2	Souris	Sécrété	[67]
IL-6	IL-6	Souris	Sécrété	[66]
IL-10	IL-10	Souris	Sécrété	
IL-12	IL-12	Souris	Sécrété	
<b>Allergènes</b>				
BLG	blg	Bovin	Sécrété/Cytoplasmique	[35,36]
<b>Facteurs de virulence</b>				
Protéine A fixant la fibronectine	fnbpA	<i>Staphylococcus aureus</i>		[64]
Clumping factor	clfA	<i>Staphylococcus aureus</i>		[61]
Protéine A	spA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ancré	[66]

**Tableau 2 (suite)** : Liste des protéines hétérologues produites par *Lactococcus lactis* et susceptibles de donner lieu à des applications médicales ou technologiques

Protéines	Gène	Origine	Mode de production	Références
<b>Enzymes</b>				
Listeriolysine	<i>Ply511</i>	Bacteriophage <i>Listeria monocytogenes</i>	Sécrété	[13]
Streptodornase		<i>Streptococcus equisimilis</i>	Sécrété	[75]
Prochymosine	<i>PC</i>	Bovin	Sécrété	[63]
Lipase	<i>lip</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Sécrété	[77] [79]
Plasmine		Bovin	Sécrété	[78]

## 4 UNE APPROCHE DANS UN OBJECTIF D'ALIMENTATION HUMAINE

La définition de la limite réglementaire entre les allégations "MGM médicaments" et "MGM aliments" sera d'une grande importance. Seuls ces derniers seraient du domaine d'expertise de l'AFSSA. En alimentation humaine, les MGM qui semblent bientôt disponibles concernent surtout l'amélioration de procédés industriels ou des modifications de saveurs des produits alimentaires.

Dans le cas de la fabrication du pain et de la bière, des microorganismes traditionnellement utilisés (levures) sont détruits par la chaleur ou éliminés par la filtration. Pour les produits laitiers en revanche, les bactéries lactiques restent présentes dans l'aliment, surtout pour les yaourts et les laits fermentés.

### 4.1 PRODUITS DE PANIFICATION, D'ŒNOLOGIE ET DE BRASSERIE

Au travers d'une lecture (rapide) des brevets, les quatre grands secteurs qui utilisent la levure comme agent de fermentation, la panification, l'œnologie, la brasserie et l'industrie de la production d'éthanol disposent aujourd'hui de levures MGM.

L'analyse des principaux brevets montre qu'à ce jour les objectifs visés concernent dans la majorité des cas l'amélioration des procédés et pour quelques-uns l'amélioration des qualités organoleptiques. Il existe aussi un brevet concernant des levures transgéniques plus résistantes au froid [9].

Aucun brevet ne cible clairement l'aspect santé. En effet, dans la plupart des cas, les corps microbiens sont séparés du produit final. Le seul cas où les levures subsistent dans le produit concerne la panification. Compte tenu des températures de cuisson du pain, il est probable qu'une forte proportion, voire la totalité des levures sera détruite lors de ce traitement.

Dans ce domaine d'activité, l'utilisation de levures vivantes n'est pas pour l'instant envisagée contrairement à l'utilisation des bactéries lactiques dans le secteur des produits laitiers.

Le tableau 3 n'a pour but que de situer l'état des recherches dans ce domaine sans vouloir être exhaustif compte tenu du nombre très élevé de brevets déposés depuis les années 1985-1986.

**Tableau 3** : Applications en œnologie et en brasserie

Organisme producteur	Domaine d'application	objectif	Références
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	œnologie	Augmenter les performances fermentaires et simplifier le procédé	[40,41]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	œnologie	Améliorer la qualité organoleptique et hygiénique du vin	[40,41]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	boulangerie	Fermentation du maltose et du mélibiose	[40] Brevet 87/201670

**Tableau 3 (suite) : Applications en oenologie et en brasserie**

Organisme producteur	Domaine d'application	objectif	Références
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	boulangerie	Fermentation lente à basse température, pâtons conservés au froid	Brevet WO 97/28693
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	boulangerie	Résistance au froid et à des teneurs élevées en sucre	Brevet EP 0 921 190 A2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	boulangerie	Meilleure hydrolyse de l'amidon et des hemicelluloses	Brevet WO 98/03630
Levure de brasserie	brasserie	Amélioration de la flaveur	Brevet US 6,468,567 B1

### Remarque

Le méthyleglyoxal est un composé dont la formation a été décrite dès 1970 lors du catabolisme du glucose chez *Escherichia coli* [10]. Au cours de la glycolyse, la di-hydroxyacétone-phosphate peut être transformée en méthyleglyoxal puis en acide D-lactique. En 1995, Inose et Murata [11] ont montré que l'utilisation, pour la production d'alcool, d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* transformée entraîne une accumulation intra-cellulaire de méthyleglyoxal à une concentration telle que l'extrait de levure puisse induire un effet mutagène. En 1997, Hashimoto *et al* [12] ont complété ce travail en montrant que la synthèse de méthyleglyoxal est nettement diminuée dans le cas d'un mutant déficient en méthyleglyoxal synthase ainsi que l'effet mutagène des extraits cellulaires testés. Bien que ces deux articles soient les seuls à notre connaissance faisant état de ce problème, ils sont fréquemment cités dans les articles qui débattent sur les risques lors de l'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés dans les aliments. Cet exemple montre, d'une part, les limites de la nature supposée prédictive de l'ingénierie génétique et, d'autre part, l'insuffisance du principe de l'équivalence en substance pour s'assurer de l'innocuité des MGM.

## 4.2 PRODUITS LAITIERS

Si les brevets dans ce domaine sont relativement peu nombreux, les analyses de la littérature font apparaître un potentiel important laissant penser que des souches de MGM ont de fortes chances d'être utilisées rapidement dans les produits laitiers dès lors que l'opinion publique deviendrait favorable. Un certain nombre de domaines d'activité sont potentiellement concernés par ces recherches, notamment pour l'amélioration des procédés de production (résistance aux stress, résistance aux infections phagiques, etc) [13,14], l'amélioration de la sécurité alimentaire grâce à la production des bactériocines à large spectre issues d'autres bactéries [15-17], l'amélioration du potentiel d'acidification du lait plus rapide ou des améliorations de la qualité organoleptique des produits laitiers (meilleure dégradation des protéines [18-20], production des agents texturants, production de composés aromatisants [21-27]. Evidemment, dans tous ces cas, les bactéries génétiquement modifiées par autoclonage ou par modification hétérologue restant dans le produit final, la sécurité sanitaire de ces produits devra être évaluée.

Il existe des bactéries lactiques receveuses que la nomenclature anglo-saxonne considère comme "Generally Regarded As Safe" (statut GRAS). Ces bactéries présentent *a priori* moins de risques en utilisation alimentaire humaine. Un groupe de travail de Comité scientifique de l'alimentation humaine<sup>15</sup> a étudié la possibilité d'introduire un système similaire au GRAS, applicable aux microorganismes et éventuellement à leurs produits tout en tenant compte des spécificités sociales et réglementaires européennes.

<sup>15</sup> On a generic approach to the safety assessment of microorganism used in feed/food and feed/food production. Working paper, Directorate C – Scientific opinions

## 5 ALIMENTATION DU BÉTAIL

Il existe peu de publications concernant l'ingestion de MGM vivants en alimentation animale. Un seul article fait état de l'utilisation de bactéries surproduisant une phytase dans l'alimentation des volailles [28]. On peut ainsi simplement noter qu'en alimentation animale :

- un certain nombre d'additifs à usage alimentaire pour les animaux, thréonine, tryptophane et lysine, sont d'ores et déjà produits par des bactéries recombinantes ;
- des enzymes (cellulase, xylanase, bêta-glucosidase, phytase....) et des microorganismes vivants sont autorisés comme additifs ;
- un nombre important de gènes d'origine très diverse codant de telles enzymes sont clonés et caractérisés, notamment de nombreuses phytases. Il est à noter que, concernant les phytases, pratiquement toutes les "grandes sociétés" ont un brevet sur le clonage et l'expression de phytases ;
- de nombreux travaux s'intéressent à l'utilisation des probiotiques (levures, lactobacilles, *Bacillus*), à leurs effets sur les performances de croissance et leurs interactions éventuelles avec la flore intestinale résidente, ainsi qu'au devenir des microorganismes ingérés et à leur dissémination ;
- des sociétés industrielles commercialisent pour l'alimentation animale des levures vivantes ainsi que toute une panoplie d'enzymes. On peut tout à fait imaginer que ces sociétés ont déjà mis au point ou ont à l'étude des souches de levures recombinées productrices de ces enzymes. Néanmoins, il est évident à ce jour que, d'un point de vue économique, les enzymes commercialisées sont accessibles à très faible coût, alors que la construction et les contraintes de mise sur le marché pour des MGM seraient, sans aucun doute, longues et coûteuses ;
- en dernier lieu, actuellement les microorganismes producteurs utilisés dans l'industrie sont "recyclés" dans l'alimentation animale (levures de brasserie par exemple), qu'en sera-t-il pour les éventuels futurs MGM ?

Le tableau 4 présente des enzymes/peptides/acides aminés qui sont produits en fermenteur et non des MGM consommés vivants.

**Tableau 4:** Applications en alimentation du bétail

	Gène	Origine	Hôte d'expression	Références
<b>Glucohydrolases</b>				
Cellulase	<i>EG1/Cel7B</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	[37,38]
Cellulase	<i>Cel7B</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	[39]
Cellulase	<i>engB</i>	<i>Clostridium cellulovorans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[58,59]
Cellulase	<i>CelA/CelD</i>	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i>	[54]
Xylanase Cellulase	<i>Xys1/Cel1</i>	<i>Streptomyces halstedii</i>	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	[29]
Xylanase	<i>xynA</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Escherichia coli</i>	[48]
Xylanase	<i>xynA</i>	<i>Thermotoga neapolitana</i>	<i>Escherichia coli</i>	[76]
<b>Phytases</b>				
Phytase thermo <sup>R</sup>	<i>fphy</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	[60]
	<i>phyL</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	[70]
	<i>phyA</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		

**Tableau 4 (suite) : Applications en alimentation du bétail**

	Gène	Origine	Hôte d'expression	Références
Phytases fongiques		<i>Peniophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	[50]
		<i>Agrocybe pediades</i>		
		<i>Ceriporia sp.</i>		
		<i>Trametes pubescens</i>		
	gène synth.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>	[30]
	<i>appA</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	US Pat 6,451,572 Lei, Xingen
	<i>phyA, phyB</i>	<i>Aspergillus niger</i>		
	<i>phyA</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[45]
	<i>appA</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces sp., Pichia sp., Hansenula sp, Candida sp.....</i>	US app.0192791 Lei, Xingen
<b>Amino acide, peptide activités antibactériennes, antitoxines.....</b>				
Buforin II	peptide 21aa	Amphibien	<i>Escherichia coli</i>	[51,52]
Plantaricin 423	<i>plaA, B, C, D</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces. cerevisiae</i>	[72]
Indirubin et autres		Banque d'ADN du sol	<i>Escherichia coli</i>	[55]
Cecropin B-Thanatin	CB-Tan	Synthétique	<i>Escherichia coli</i>	[73]
Magainin-melittin	MA-E	Synthétique	<i>Escherichia coli</i>	[46]
Lactonohydrolase	<i>zhd101</i>	Fongique	<i>Escherichia coli, Schizosaccharomyces pombe</i>	[69]
Epoxide hydrolase	mEH + CYP1A2	Humaine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[47]
Elongase		<i>Thraustochytrium aureum</i>	<i>Escherichia coli, Bacillus subtilis, levures</i>	US pat 0138874 Mukerji

## 6 TECHNOLOGIE DE LA CHIMIE VERTE ET LA BIOREMEDIATION

L'avantage de la chimie vert pour le consommateur réside principalement dans la mise au point de procédés plus respectueux de l'environnement, notamment en ce qui concerne les résidus toxiques associés à la production pétrochimique.

La bioremédiation peut être appliquée à la dégradation de toute une liste de contaminants généralement de l'eau et du sol comme les hydrocarbures aromatiques, les polychlorobiphényles (PCB), le fioul, l'essence, les métaux lourds (tels que le cuivre, cadmium, chrome et mercure), les pesticides, les huiles, et de déchets des diverses industries.

Un brevet concernant une souche de *Pseudomonas aeruginosa* modifiée génétiquement pour être utilisée dans la dégradation des hydrocarbures fut déposé en 1980 par Ananda Chakrabarty. Historiquement, ce brevet sera le premier brevet déposé concernant un organisme transgénique.

Depuis, les constructions de MGM pour traiter les polluants sont nombreuses dans les laboratoires mais actuellement aucune souche recombinante n'est commercialisée pour la bioremédiation. Par contre plusieurs groupes académiques en USA, comme par exemple à l'Université de Tennessee, ont obtenu une autorisation du gouvernement pour tester leurs bactéries recombinantes sur le terrain.

Les MGM pourraient être intéressants dans le cas de dégradations de produits récalcitrants comme les xénobiotiques ou pour des produits pour lesquels les voies de dégradation naturelles n'existent pas.

### Brevets

Il existe beaucoup de brevets sur les techniques proprement dites et moins sur les produits (tableau 5).

**Tableau 5 : Technologie de la chimie verte**

Composé	Microorganisme	Brevet
Dérivés d'oxaloacétate	<i>Escherichia coli</i>	US Pat 6 455 284
L-isoleucine	<i>Corynebacterium</i>	US Pat 6 451 564
L-acides aminés	<i>Corynebacterium</i>	US Pat 6 355 454
Bêta-Carotène	<i>Fusarium</i>	US Pat 6 372 479
Keto-caroténoïdes	?	US Pat 5 910 433
Glucosamine	?	US Pat 6 372 457
Polyhydroxyalkanoates (plastique)	Divers	US Pat 6 329 183
Xylitol	Levure	US Pat 6 271 007
4-hydroxybenzoate	?	US Pat 6 114 157
1,3-propanediol	<i>Escherichia coli</i>	US Pat 6 136 576
Ethanol	Levure, <i>Zymomonas</i>	US Pat 5 424 202
Cis-cis muconate/catéchol	<i>Pseudomonas</i> sp	US Pat 5 616 496
Hydrocortisone	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CNRS-Aventis

### Publications

De très nombreuses publications dans ce domaine traduisent l'intérêt de l'industrie chimique pour toute une série de composés dont certains portent sur des applications chimiques proprement dites et d'autres plutôt sur des applications pharmaceutiques (intermédiaires de synthèse).

### Travaux engagés

Si nous regardons les moyens financiers mobilisés, notamment aux Etats Unis mais aussi en Europe, nous voyons le développement d'un certain nombre de programmes de grande envergure. Ceci est un indicateur d'un intérêt grandissant pour la chimie verte ayant principalement pour objectif d'accroître l'usage des ressources renouvelables.

### Exemples

Bioéthanol (construction des souches pour la production d'éthanol à partir de lignocellulose)

Dégradation des molécules organophosphorées

Solvants (amélioration de la tolérance aux solvants)

Isoprénoïdes

Porphyrines non-naturelles avec une souche d'*Escherichia coli* recombinante

Caroténoïdes

Synthèse des arômes alimentaires par une souche d'*Escherichia coli* recombinante

## 7 SECURITE SANITAIRE ET PROBIOTIQUES MGM

Les procédures actuelles qui mettent en œuvre des MGM à des fins de production de molécules diverses (usage confiné) exigent que les produits finaux soient purifiés (au moins partiellement), qu'il n'y ait pas d'ADN résiduel et que les résidus des processus fermentaires ne contiennent plus de MGM vivants. L'idée générale est de prévenir tout transfert de gènes de ces MGM vers la microflore autochtone digestive de l'homme ou celle de l'environnement. Ce domaine du "génétiquement correct", plus avancé que celui des plantes, est maîtrisé à la fois par les chercheurs du secteur public et des grandes industries privées.

Le développement probable de MGM vivants utilisés en alimentation humaine et animale a conduit le *Codex Alimentarius* à rédiger des directives régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité



sanitaire des aliments produits à l'aide de microorganismes à ADN recombiné<sup>16</sup>. Ces directives recensent les risques potentiels liés à la consommation de produits contenant ou issus de ces MGM et définissent les éléments pertinents pour évaluer ces risques.

## 7.1 DANGERS ET RISQUES POTENTIELS

Des considérations précédentes, et en se limitant aux probiotiques MGM non médicamenteux, on peut déduire les risques potentiels suivants :

- a- Une modification du métabolisme du MGM pourrait conduire à un effet délétère inattendu sur le consommateur directement ou indirectement. Les conditions de construction font que ce risque devrait pouvoir être contrôlé. Le produit du transgène n'est en principe pas dangereux par lui-même. Cependant, sa sur-expression peut entraîner des désordres au niveau du tractus intestinal.
- b- Le MGM peut être résident ou hôte transitoire, ce qui change son statut fonctionnel et sa relation avec la flore.
- c- Le MGM peut modifier l'équilibre de la flore intestinale par des interactions inattendues avec les bactéries résidentes, ou favoriser l'installation de pathogènes (que ce MGM soit résident ou non). Les probiotiques actuels n'ont pas cet effet mais la présence d'une fonction supplémentaire apportée par le MGM est à considérer.

## 7.2 MAITRISE DES DANGERS ET RISQUES

La maîtrise des dangers et des risques de ces MGM nécessite une évaluation *a priori* qui peut s'appuyer sur une comparaison avec un microorganisme utilisé dans un produit traditionnel dit de référence. Même si dans la plupart des cas, ces MGM et les gènes introduits seront issus de souches de microorganismes déjà connues pour leur utilisation en agroalimentaire, une analyse du risque pour chaque couple bactérie receveuse/construction génétique reste indispensable.

Les constructions génétiques devront remplir certains critères indispensables :

- l'absence de gènes de résistance aux antibiotiques utilisés comme marqueur ;
- des constructions insérées dans le chromosome et ne comportant pas d'éléments génétiques mobiles de type transposon ou plasmide ;
- le point d'insertion dans le chromosome identifié ;
- aucune séquence codante étrangère en dehors du gène considéré à l'origine de la classification en OGM.

Les outils disponibles dans le domaine des MGM rendent ces exigences accessibles. Un promoteur conditionnel gouvernant le gène d'intérêt (par exemple celui de la nisine chez certaines bactéries lactiques) pourra être éventuellement utilisé.

Les risques qu'il conviendrait d'examiner plus particulièrement seraient, du fait de l'introduction d'un nouveau microorganisme, la perte de l'effet de barrière au niveau intestinal exercé par la flore autochtone favorisant ainsi la prolifération de germes pathogènes et les éventuelles altérations des fonctions métaboliques de la flore intestinale normale. Ces effets ne sont pas observés avec les probiotiques actuellement utilisés.

Le rapport de la consultation d'experts FAO-OMS de septembre 2001 intitulé "Safety assessment of food derived from genetically modified microorganisms" consacre notamment un chapitre à la sécurité et à l'évaluation nutritionnelle ainsi qu'à l'interaction entre le MGM, la flore intestinale et l'hôte mammifère.

---

<sup>16</sup> Guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms. Alinorm 03/34A. Codex Alimentarius Joint FAO/WHO Food Standards Programme.

Parmi les points à documenter, figurent :

- la colonisation et la persistance du microorganisme dans l'intestin et l'éventuel impact sur l'écosystème digestif,
- les aspects nutritionnels et toxicologiques des éventuels métabolites bactériens ou fongiques, et leur altération possible du fait des modifications génétiques,
- le potentiel allergisant de ces microorganismes ainsi modifiés,
- la survie et la propagation de ces microorganismes dans l'environnement (apport direct ou indirect *via* l'homme ou l'animal) et les conséquences en matière de santé publique.

Le contrôle du métabolisme des MGM probiotiques (transcriptome, protéome, métabolome ?), bien que ne reflétant pas nécessairement les événements métaboliques *in situ*, constitue une approche intéressante.

Les études de sécurité d'effets sur la flore intestinale relèvent de moyens qui peuvent être mis en œuvre, par exemple par analyse bactériologique des fèces d'une cohorte de volontaires "normaux". Ces études lourdes ne sont à envisager que lorsqu'il y aura un risque supposé.

Le document de l'AFSSA<sup>17</sup> intitulé "Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agroalimentaire – souches nouvelles ou modifiées – application différente de souches déjà utilisées" consacre un chapitre au "cas de souche destinée à être consommée vivante dans la denrée alimentaire". Outre le préalable indispensable sur la bonne caractérisation de la souche (données taxonomiques fiables et pertinentes) et l'absence de risque pathogène ou toxigène, il est suggéré des essais chez l'animal de laboratoire (90 jours) visant à documenter la tolérance locale et les éventuelles toxicités systémiques du MGM administré par voie orale (voire parentérale).

Le risque environnemental est un point important à considérer dans la mesure où il peut avoir un impact sur les équilibres écologiques microbiens mais également sur l'homme au travers de la contamination des sols et des animaux. L'évaluation du risque pour l'environnement relève de la commission du génie biomoléculaire.

En tout état de cause, les MGM devront être examinés au cas par cas et analysés en termes de bénéfices/risques.

---

<sup>17</sup> Document disponible sur le site [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)

## Références bibliographiques

- 1 Periti P., Tonelli F. (2001) Preclinical and clinical pharmacology of biotherapeutic agents: *Saccharomyces boulardii*. *J Chemother* 13:473-93.
- 2 Drouault S., Corthier G. (2001) Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk.. *Vet Res* 32:101-17.
- 3 Isolauri E., Kirjavainen P.V. Salminen S. (2002) Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50:III54-9.
- 4 Marteau, P.R., de Vrese M., Cellier C.J., Schrezenmeir J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73:430S-436S.
- 5 Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. Mattila-Sandholm T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84:197-215.
- 6 Mercenier A, Pavan S, Pot B. (2003) Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects *Curr Pharm* 9:175-91.
- 7 Forde A., Fitzgerald G.F. (1999) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:89-113.
- 8 Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289(5483): 1352-5.
- 9 Bourgeois E, Gautier M.F, Joudrier P. (2000) Levures transformées par des gènes augmentant leur tolérance au stress froid. WO 02051978.
- 10 Cooper R.A. and Anderson Anne (1970). The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 11: 273276.
- 11 Inose T. and Murata K. (1995) Enhanced accumulation of toxic compound in yeast cells having high glycolytic activity: a case study on the safety of genetically engineered yeast. *Int. J. of Food Science and Technology*, 30: 141-146.
- 12 Hashimoto W., Inose T., Masuda K., Murata K. (1997) Safety assessment of genetically engineered yeast: elimination of mutagenicity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by decreasing the activity of methylglyoxal synthase. *Int. J. of Food Science and Technology* 32: 521-526.
- 13 Gaeng S, Scherer S, Neve H, Loessner MJ. (2000) Gene Cloning and Expression and Secretion of *Listeria monocytogenes* Bacteriophage-Lytic Enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2951-2958.
- 14 Wouters J.A., Mailhes M., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (2000) Physiological and Regulatory Effects of Controlled Overproduction of Five Cold Shock Proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Appl Environ Microbiol.* 66: 3756-3763.
- 15 Horn N., Martínez M.I., Martínez J.M., Hernández P.E., Gasson M.J., Rodríguez J.M., Dodd H.M. (1999). Enhanced Production of Pediocin PA-1 and Coproduction of Nisin and Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4443-4450.
- 16 Martínez J.M., Kok J, Sanders J.W., Hernández P.E. (2000) Heterologous Coproduction of Enterocin A and Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: Detection by Specific Peptide-Directed Antibodies. *Appl Environ Microbiol.* Aug; 66: 3543-3549.
- 17 Li H., O'Sullivan D.J. (2002) Heterologous Expression of the *Lactococcus lactis* Bacteriocin, Nisin, in a Dairy Enterococcus Strain. *Appl Environ Microbiol.* Jul; 68: 3392-3400.
- 18 Luoma S., Peltoniemi K., Joutsjoki V., Rantanen T., Tamminen M., Heikkinen I., Palva A. (2001) Expression of Six Peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.*, 67: 1232-1238.
- 19 Leenhouts K., Bolhuis A., Boot J., Deutz I., Toonen M., Venema G., Kok J., Ledebøer A. (1998). Cloning, Expression and Chromosomal Stabilization of the *Propionibacterium shermanii* Proline Imino-peptidase Gene (pip) for Food-Grade Application in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 64:4736-4742.

- 20 Wegmann U, Klein JR, Drumm I, Kuipers OP, Henrich B. (1999) Introduction of Peptidase Genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and Controlled Expression. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4729-4733.
- 21 Lapiere L, Germond JE, Ott A, Delley M, Mollet B. (1999) d-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhD*) Inactivation and Resulting Metabolic Effects in the *Lactobacillus johnsonii* Strains La1 and N312. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4002-4007.
- 22 Lopez de Felipe F., Kleerebezem M., de Vos W.M., Hugenholtz J. (1998) Cofactor Engineering: a Novel Approach to Metabolic Engineering in *Lactococcus lactis* by Controlled Expression of NADH Oxidase. *J Bacteriol.* 180: 3804-3808.
- 23 Hugenholtz J, Kleerebezem M, Starrenburg M, Delcour J, de Vos W, Hols P. (2000) *Lactococcus lactis* as a Cell Factory for High-Level Diacetyl Production. *Appl Environ Microbiol.* 66: 4112-4114.
- 24 Van Kranenburg R, de Vos WM. (1998) Characterization of Multiple Regions Involved in Replication and Mobilization of Plasmid pNZ4000 Coding for Exopolysaccharide Production in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 180: 5285-5290.
- 25 Van Kranenburg R, Vos HR, van Swam II, Kleerebezem M, de Vos WM. (1999) Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from *Lactococcus lactis* and Other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity. *J Bacteriol.* 181: 6347-6353.
- 26 Rijnen L., Bonneau S., Yvon M. (1999) Genetic Characterization of the Major Lactococcal Aromatic Aminotransferase and Its Involvement in Conversion of Amino Acids to Aroma Compounds. *Appl Environ Microbiol.* Nov; 65: 4873-4880.
- 27 Andersen H.W., Solem C., Hammer K., Jensen P.R. (2001) Reduction of Phosphofructokinase Activity in *Lactococcus lactis* Results in Strong Decreases in Growth Rate and in Glycolytic Flux. *J Bacteriol.* 183: 3458-3467.
- 28 Lan G.Q., Abdullah N., Jalaludin S., Ho Y.W. (2002) Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poult. Sci.* 81(10) : 1522-32
- 29 Adham S.A., Campelo A.B., Ramos A., Gil J.A.. (2001) Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol.* 67(12):5425-30.
- 30 Bei J.L., Chen Z., Yang L., Liao L., Wang X.Z., Jiang Z.Y. (2001) Overexpression of artificial synthetic gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 17(3):254-8.
- 31 Beliavskaia V.A., Kashperova T.A., Bondarenko V.M., Il'chev A.A., Sorokulova I.B., Malik N.I. (2001). Experimental evaluation of the biological safety of gene-engineered bacteria using a model strain *Bacillus subtilis* interferon-producing strain]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2001, 2:16-20.
- 32 Beninati C, Oggioni M.R., Boccanera M., Spinosa M.R., Maggi T., Conti S., Magliani W., De Bernardis F., Teti G., Cassone A., Pozzi G., Polonelli L (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 18(10): 1060-4.
- 33 Beninati C., Oggioni M., Mancuso G., Midiri A., Polonelli L., Pozzi G., Teti G. (2001) Anti-idiotypic vaccination against group *B streptococci*. *Int Rev Immunol* 20(2): 263-73.
- 34 Bermudez-Humaran L.G., Langella P., Miyoshi A., Gruss A., Guerra R.T., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y. (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 68(2): 917-22.
- 35 Bernasconi E., Germond J.E., Delley M., Fritsche R., Corthesy B. (2002) *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine beta-lactoglobulin fusion proteins. *Appl Environ Microbiol* 68(6): 2917-23.
- 36 Chatel J.M., Langella P., Adel-Patient K., Commissaire J., Wal J.M., Corthier G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(3): 545-51.

- 37 Collen A., Ward M., Tjerneld F., Stalbrand H.. (2001) Genetic engineering of the *Trichoderma reesei* endoglucanase I (Cel7B) for enhanced partitioning in aqueous two-phase systems containing thermoseparating ethylene oxide–propylene oxide copolymers *J Biotechnol.* 4;87(2):179-91.
- 38 .Collen A., Ward M., Tjerneld F., Stalbrand H. (2001) Genetically engineered peptide fusions for improved protein partitioning in aqueous two-phase systems. Effect of fusion localization on endoglucanase I of *Trichoderma reesei*. *J Chromatogr A.* 2;910(2):275-84.
- 39 Collen A, Selber K, Hyytia T, Persson J, Nakari-Setälä T, Bailey M, Fagerstrom R, Kula MR, Penttilä M, Stalbrand H, Tjerneld F. (2002) Primary recovery of a genetically engineered *Trichoderma reesei* endoglucanase I (Cel 7B) fusion protein in cloud point extraction systems.*Biotechnol Bioeng.* 20;78(4):385-94.
- 40 Dequin S. (2001) The potential of genetic engineering for improving wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 : 577-588.
- 41 Dequin S., Salmon J.M., Huu-vang Nguyen and B. Blondin (2002). Wine Yeast's.
- 42 Di Fabio S., Medaglini D., Rush C.M., Corrias F., Panzini G.L., Pace M., Verani P., Pozzi G., Titti F. (1998). Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with *Streptococcus gordonii* expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. *Vaccine* 16(5): 485-92.
- 43 Duc le H., Hong H.A., Fairweather N., Ricca E., Cutting S.M. (2003) Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infect Immun.* 71:2810-8.
- 44 Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. (2001) Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl Environ Microbiol* 67(4): 1423-8.
- 45 Han Y., Wilson D.B., Lei X.G. (1999) Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 65(5):1915-8.
- 46 Huang Y., Liu F.P., Zhou T.H., Zhu J.M. (2001) Cloning and expression of a synthetic gene encoding magainin-melittin hybrid peptide in *Escherichia coli* and studies on its antibacterial activity. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 17(2):207-10
- 47 Kelly E.J., Erickson K.E., Sengstag C., Eaton D.L. (2002) Expression of human microsomal epoxide hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a functional role in aflatoxin B1 detoxification. *Toxicol Sci.* 65(1):35-42.
- 48 Keen N.T., Boyd C., Henrissat B. (1996) Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact.* 9(7):651-7.
- 49 Langella P., Le Loir Y. (1999) Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. *Braz J Med Biol Res* 32(2): 191-8.
- 50 Lassen S.F., Breinholt J., Ostergaard P.R., Brugger R., Bischoff A., Wyss M., Fuglsang C.C.. (2001) Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol.* 67(10):4701-7.
- 51 Lee J.H., Minn I., Park C.B., Kim S.C. (1998) Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 12(1):53-60.
- 52 Lee J.H., Kim M.S., Cho J.H., Kim S.C. (2002) Enhanced expression of tandem multimers of the antimicrobial peptide buforin II in *Escherichia coli* by the DEAD-box protein and trxB mutant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58(6):790-6.
- 53 Lee M.H., Roussel Y., Wilks M., Tabaqchali S. (2001) Expression of Helicobacter pylori urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against H. pylori infection in mice. *Vaccine* 19(28-29): 3927-35.
- 54 Lopez-Contreras A.M., Smidt H., van der Oost J., Claassen P.A., Mooibroek H., de Vos W.M. (2001) *Clostridium beijerinckii* cells expressing *Neocallimastix patriciarum* glycoside hydrolases show enhanced lichenan utilization and solvent production *Appl Environ Microbiol.* 67(11):5127-33.

- 55 MacNeil I.A., Tiong C.L., Minor C., August P.R., Grossman T.H., Loiacono K.A., Lynch B.A., Phillips T., Narula S., Sundaramoorthi R., Tyler A., Aldredge T., Long H., Gilman M., Holt D., Osburne M.S. (2001). Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(2):301-8.
- 56 Mauriello E.M., Duc le H., Isticato R., Cangiano G., Hong H.A., Felice M.D., Ricca E., Cutting S.M. (2004). Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine.* 22:1177-87.
- 57 Medaglini D, Oggioni MR, Pozzi G. (1998). Vaginal immunization with recombinant gram-positive bacteria. *Am J Reprod Immunol* 39(3): 199-208.
- 58 Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. (2002) Thermostabilization of cellulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by *in vitro* DNA recombination with non-cellulosomal endoglucanase EngD *Mol Microbiol.* 45(3):617-26.
- 59 Murashima K., Chen C.L., Kosugi A., Tamaru Y., Doi R.H., Wong S.L. (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes *J Bacteriol.*184(1):76-81.
- 60 Peng RH, Xiong AS, Li X, Fan HQ, Yao QH, Guo MJ, Zhang SL. (2002) High expression of a heat-stable phytase in *Pichia pastoris*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34(6):725-30.
- 61 Que Y.A., Haefliger J.A., Francioli P., Moreillon P. (2000) Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis subsp. cremoris* using a new shuttle vector. *Infect Immun* 68(6): 3516-22.
- 62 Ribeiro L.A., Azevedo V., Le Loir Y., Oliveira S.C., Dieye Y., Piard J.C., Gruss A., Langella P. (2002). Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl Environ Microbiol*, 68(2): 910-6.
- 63 Simons G., Rutten G., Hornes M., Nijhuis M., van Asseldonk M. (1991) Production of prochymosin in lactococci. *Adv Exp Med Biol* 306: 115-9.
- 64 Sinha B., Francois P., Que Y.A., Hussain M., Heilmann C., Moreillon P., Lew D., Krause K.H., Peters G., Herrmann M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68(12): 6871-8.
- 65 Slos P., Dutot P., Reymund J., Kleinpeter P., Prozzi D., Kieny M.P., Delcour J., Mercenier A., Hols P. (1998). Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett* 169(1): 29-36.
- 66 Steidler L., Robinson K., Chamberlain L., Schofield K.M., Remaut E., Le Page R.W., Wells J.M. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 66(7): 3183-9.
- 67 Steidler L., Wells J.M., Raeymaekers A., Vandekerckhove J., Fiers W., Remaut E. (1995) Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Appl Environ Microbiol* 61(4): 1627-9.
- 68 Sorokulova I.B. (1998) The safety and reactogenicity of the new probiotic subalin for volunteers. *Mikrobiol Z.* 60(1):43-6.
- 69 Takahashi-Ando N., Kimura M., Kakeya H., Osada H., Yamaguchi I. (2002) A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochem J.* 365(Pt 1):1-6.
- 70 Tye A.J., Siu F.K., Leung T.Y., Lim B.L. (2002) Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(2-3):190-7.
- 71 Urdaci M.C., Pinchuk I.V., Sorokulova I.B., Megraud F. (2003) Use of *Bacillus subtilis* strain CU1 as a vaccine delivery system for mucosal immunization against *Helicobacter pylori* infection in mice. FEMS Congress, Bacillus 2003 satellite symposium, Ljubljana, Slovenia.
- 72 Van Reenen C.A., Chikindas M.L., Van Zyl W.H., Dicks L.M. (2003) Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol.* 81(1):29-40.

- 73 Weng H.B., Niu B.L., Meng Z.Q., Xu M.K. (2002) Cloning and expression of the cecropin B-thanatol hybrid antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 18(3):352-5. Chinese.
- 74 Wells J.M., Robinson K., Chamberlain L.M., Schofield K.M., Le Page R.W. (1996) Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70(2-4): 317-30.
- 75 Wolinowska R., Ceglowski P., Kok J., Venema G. (1991) Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* of the DNase (streptodornase)-encoding gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene* 106(1): 115-9.
- 76 Zverlov V, Piotukh K, Dakhova O, Velikodvorskaya G, Borriss R. (1996) The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45(1-2):245-7.
- 77 Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D., Renault P. (2002) Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing Staphylococcus hyicus lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 68(6): 3166-8.
- 78 Arnau J., Hjerl-Hansen E., Israelsen H. (1997) Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48:331-8.
- 79 Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D., Renault P. (2000) Expression of the Staphylococcus hyicus lipase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):588-98.

#### BREVETS CITES

Brevet WO 97/28693, déposant Lesaffre.

Brevet 87/201670 Gist-brocades.

Brevet EP 0 921 190 A2, 1999, Oriental Yeast CO LTD, Japon.

Brevet WO 98/03630 Espagne.

Brevet US Ppat 6,468,567 B1, 2002, Cerveceria Polar, Vénézuéla.

Brevet US Pat 0138874 2002 Mukerji ("Elongase").

Brevet US Pat 6,451,572, 2002, Lei, Xingen.

Brevet US Pat N° 6,455,284 :Metabolically engineered E. coli for enhanced production of oxaloacetate-derived biochemicals. University of Georgia Research Foundation, 2002.

Brevet US Pat N° 6,451,564: Methods for producing L-isoleucine, Massachusetts Institute Technology, 2002.

Brevet US Pat N° 6,355,454: Process for the fermentative production of L-amino acids using coryneform bacteria. Degussa Huls AG, 2002.

Brevet US Pat N° 6,372,479: Fusarium sporotrichioides strains for production of  $\beta$ -carotene. US Government, 2002.

Brevet US Pat N° 5,910,433: Keto group-introducing enzyme, DNA coding therefor and method for producing keto-carotenoids. Kirin Beer Kabushiki Kaisha, 1999.

Brevet US Pat N° 6,372,457: Process and materials for production of glucosamine. Arikon Life Sciences LLC, 2002.

Brevet US Pat N° 6,329,183: Polyhydroxyalkanoate production from polyols. Metabolix Inc, 2001.

Brevet US pat N° 6,271,007: Yeast strains for the production of xylitol, Xyrofin Oy, 2001.

Brevet US Pat N° 6,114,157: Method for increasing total production of 4-hydroxybenzoic acid by biofermentation. General Electric Company, 2000.

Brevet US Pat N° 6,136,576: Method for the recombinant production of 1,3-propanediol. Genencor International, 2000.

Brevet US Pat N° 5,424,202: Ethanol production by recombinant hosts. University Florida, 1995.

Brevet US Pat N° 5,616,469: Bacterial cell transformants for production of cis, cis-muconic acid and catechol, Purdue Research Foundation, 1997.



## RESUME ET CONCLUSIONS

---

La question posée en titre "OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ?" a été illustrée par l'étude de quatre cas dont on peut tirer une conclusion de portée générale. Elle conduit à mettre en parallèle, dans le cas des OGM, la problématique de l'évaluation des bénéfices avec celle du risque. Examinons d'abord les conclusions auxquelles nous sommes parvenus pour chacun des quatre cas.

- L'introduction de nouvelles variétés de **plantes résistant aux attaques d'insectes** aurait un double effet bénéfique sur la santé en diminuant l'exposition du consommateur tant aux insecticides qu'aux mycotoxines.

Tout en se gardant de généralisations hâtives, il semble bien que, sur ces deux points, une diminution de cette exposition soit effectivement observée. Ainsi, d'une part, par exemple, une réduction significative de l'emploi des produits phytosanitaires (dont les insecticides) a accompagné l'introduction des variétés de plantes résistantes à des insectes en Amérique du Nord et en Extrême Orient. D'autre part, du fait que la résistance aux insectes se trouve corrélée à une moindre sensibilité des végétaux aux moisissures, quelques résultats incontestables démontrent une moindre contamination de certains de ces végétaux (le maïs) par des mycotoxines telles que les fumonisines. Concernant ce deuxième point, l'intérêt de cette moindre contamination en mycotoxines est suggéré par l'observation d'une meilleure croissance chez le porc et le poulet nourris avec du maïs résistant à des insectes qu'avec du maïs conventionnel.

Il semble donc cohérent d'estimer que l'utilisation de ces variétés résistantes aux insectes puisse avoir un effet bénéfique pour la santé. Difficile de dire pour autant que ces bénéfices soient assurés et généraux. Si la toxicité des insecticides et des mycotoxines est bien documentée, il n'existe que peu d'études épidémiologiques permettant de mesurer leur impact réel sur la santé des consommateurs. Il est donc très difficile actuellement d'évaluer les effets d'une réduction de l'exposition à ces molécules qui pourraient résulter de l'introduction des variétés résistantes à des insectes. Pour les insecticides, l'intérêt pour l'agriculteur qui manipule ces produits ne fait guère de doute, mais cet intérêt ne peut être démontré aujourd'hui pour le consommateur. Dans le cas des mycotoxines, il importerait de comparer l'effet à long terme de traitements avec insecticides à la culture de variétés résistantes.

- L'introduction de **variétés tolérantes à un herbicide** particulier serait susceptible de privilégier l'utilisation d'herbicides moins dangereux pour la santé que ne le sont ceux utilisés dans la culture de variétés conventionnelles.

Cette question a été abordée dans le cas de la betterave tolérante au glyphosate. Le désherbage des variétés conventionnelles fait appel à 7 herbicides principaux qui, aux concentrations utilisées, sont considérés comme ne présentant pas de risques pour la santé. Dans le cas particulier de la betterave, les procédés d'épuration et de cristallisation conduisent à une absence de résidus détectables d'herbicides dans le sucre blanc. On ne peut donc pas attendre que la réduction de l'utilisation de ces herbicides ait un bénéfice direct sur les consommateurs du sucre de betterave.

Par contre, la question reste posée pour l'agriculteur et, de façon indirecte, pour l'environnement. Par rapport aux autres herbicides, le glyphosate, du fait de ses caractéristiques physico-chimiques (faible liposolubilité, faible volatilité) présente un risque plus limité pour l'agriculteur. En revanche, sa plus grande solubilité et stabilité en milieu aqueux en font un pesticide susceptible de présenter des inconvénients plus grands pour l'environnement. L'impact de cette pollution sur la santé des populations reste à déterminer. Noter que dans ces comparaisons entre herbicides, il faut prendre en compte non seulement les propriétés de la molécule active elle-même, mais également celles des adjuvants présents dans les formulations.

- Le **cas du "riz doré"** est emblématique bien qu'encore insuffisamment documenté. La création de cette variété de riz enrichie en précurseur de la vitamine A fait l'objet d'intenses controverses. Pour certains, elle démontre que les plantes transgéniques représentent une avancée technologique susceptible d'apporter des solutions aux graves problèmes que pose l'alimentation dans les pays en voie de développement. Pour d'autres, ce riz ne pourrait en aucun cas pallier les carences en vitamine A auxquelles on pourrait remédier par d'autres moyens si une politique volontariste était mise en oeuvre.

Le débat porte essentiellement sur la quantité de riz qu'il faudrait ingérer pour pallier la carence en vitamine. L'étude présentée ici fait apparaître les incertitudes qui pèsent sur l'évaluation de cette quantité et recherche les causes de cette incertitude. On constate que, selon les hypothèses retenues, la consommation journalière de riz nécessaire pour remédier de façon significative aux carences en vitamine A va de 90 à 4500 g. La consommation journalière moyenne de riz dans les pays considérés étant de 250 à 300 g, une telle fourchette permet évidemment à tous les protagonistes de produire des chiffres conformes à leur point de vue.

Une conclusion raisonnable serait qu'il est trop tôt pour dire si les variétés disponibles actuellement pourront apporter une solution aux problèmes de carence en vitamine A, mais que les travaux sur le "riz doré" montrent que la conception et l'élaboration de plantes transgéniques à des fins nutritionnelles, notamment au bénéfice des pays en voie de développement, n'est pas une utopie. En tout état de cause, cette approche reste exemplaire de par sa conception.

- Alors que les trois premiers chapitres concernent des plantes transgéniques, le quatrième concerne une autre catégorie d'OGM, les **"Microorganismes Génétiquement Modifiés"** ou MGM. Alors que de nombreux produits issus de MGM sont déjà autorisés dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire, il s'agit là de microorganismes (bactéries, levures, moisissures) qui, à l'état vivant, pourraient faire partie de préparations pharmaceutiques, être ingérés dans un but nutritionnel avec l'aliment ou la boisson (produits laitiers, en particulier) ou être utilisés dans divers procédés de dépollution. Si de tels microorganismes ne sont pas encore disponibles sur le marché, ils pourraient faire l'objet prochainement de demandes d'autorisation. Ce chapitre se présente essentiellement comme un inventaire des travaux en cours sur ces MGM, l'évaluation de leurs bénéfices, tout autant, que de leurs risques restant à faire. Pour ceux qui pourraient faire partie de préparations pharmaceutiques, l'évaluation de leurs risques et de leurs bénéfices devrait s'inscrire dans la démarche, désormais classique, de l'évaluation des médicaments.

L'analyse de ces quatre "cas d'école" fait apparaître qu'il existe effectivement des données suggérant que les OGM considérés puissent apporter des bénéfices pour la santé humaine, mais que la quantification de ces bénéfices est difficile à réaliser surtout pour les OGM de première génération, dont on n'a pas cherché à modifier la composition nutritionnelle. Dans la plupart des cas, cette évaluation quantitative paraît très difficile, pour ne pas dire hors de portée. Pourtant, si l'on y regarde bien, elle pourrait présenter moins de difficultés que celle, en théorie pratiquée de façon courante, de l'évaluation des risques. Revenons sur cette dernière.

Classiquement, l'évaluation des risques alimentaires comporte, en premier lieu, une identification des dangers liés à un produit ou à un microorganisme puis une prise en compte de la probabilité d'exposition à ce produit ou à ce microorganisme et des conséquences éventuelles de cette exposition. Cette démarche s'applique sans grands problèmes lorsque l'on s'interroge sur les risques liés à la présence d'une molécule de toxicité connue ou d'une bactérie pathogène dans un aliment. Dans le cas des OGM destinés à la consommation, la difficulté est beaucoup plus grande car, à ce jour, aucun problème de santé, qu'il s'agisse de toxicité ou d'allergénicité, n'a pu être spécifiquement attribué à un OGM mis sur le marché<sup>18</sup>. Cela n'exclut pas qu'il puisse exister un risque mais aujourd'hui celui-ci ne peut être ni précisément identifié, ni *a fortiori* quantifié. Cela explique qu'il puisse y avoir assez fréquemment des divergences d'opinion dans l'évaluation des risques des OGM,

<sup>18</sup> La mise sur le marché des OGM et des produits issus d'OGM est soumise à autorisation expresse, accordée au cas par cas au niveau européen. En France, comme dans chaque Etat membre de l'Union européenne, des commissions d'experts spécialisés examinent chaque demande d'autorisation de mise sur le marché et évaluent les risques liés à l'introduction de ces produits dans notre alimentation.

tous les experts n'ayant pas nécessairement la même perception du degré de précaution à mettre en œuvre face à ce risque non quantifiable.

Au regard de cette difficulté fondamentale dans l'évaluation des risques liés à la consommation des OGM, l'évaluation des bénéfices pourrait paraître plus simple. Les bénéfices, en effet, contrairement aux dangers, sont identifiés. Si l'on prend le cas des mycotoxines, par exemple, on connaît leurs effets biologiques et l'on sait qu'elles peuvent contaminer les végétaux servant à l'alimentation humaine et animale. On devrait donc pouvoir, en théorie, tenter d'évaluer quantitativement le risque d'exposition à ces toxines et la réduction de ce risque résultant de l'introduction de variétés de plantes résistantes à des insectes. On tendrait ainsi vers une évaluation quantitative de ce bénéfice pour la santé. C'est probablement la démarche qu'il faudrait entreprendre préalablement à toute évaluation de demande de mise sur le marché d'un OGM supposé apporter des bénéfices en matière de santé. Ces éventuels bénéfices pour la santé ne seront évidemment pas les seuls à prendre en compte dans la décision finale. Ceux qui pourraient concerner les différents acteurs de la filière de production ou l'environnement mériteront également d'être pris en considération, mais ils ne relèvent pas de l'expertise de l'AFSSA, du moins dans le cadre de ses missions actuelles.

Cette évaluation des bénéfices deviendra rapidement une nécessité si les OGM dits "de première génération" parviennent à s'imposer sur le marché. En effet si, comme nous l'avons vu, ces OGM conçus principalement à des fins économiques ne présentent sans doute qu'un bénéfice restreint pour la santé, il est évident que, dans un avenir proche, émergeront des OGM conçus pour présenter un intérêt direct sur le plan nutritionnel ou en termes de prévention de pathologies. On voit ainsi apparaître des variétés de riz et de soja hypoallergéniques, des protéagineux renfermant une plus grande quantité d'acides aminés indispensables, des oléagineux dont la composition en acides gras est en passe d'être modifiée afin d'obtenir des huiles de table de meilleure qualité ou des "aliments" permettant d'envisager des formes de vaccination orale. En outre, des plantes transgéniques en cours de développement pourraient être capables de lutter contre des stress abiotiques (salinité excessive et sécheresse notamment) et pourraient contribuer à mieux préserver l'environnement et à rendre possibles certaines cultures sur des sols considérés aujourd'hui comme impropres à l'agriculture.

Pour tous ces OGM dits de "deuxième génération", il importera de conduire en parallèle, et au cas par cas, une évaluation des bénéfices pour la santé, directs ou indirects par le biais de la protection de l'environnement, en même temps qu'une évaluation des risques. On devra en outre s'interroger sur la possibilité d'obtenir les mêmes bénéfices par d'autres stratégies. On tendra ainsi, pour ces nouveaux aliments, vers une analyse du rapport bénéfices/risques comparable à celle qui prévaut avant la mise sur le marché d'un médicament.