

Maisons-Alfort, le 26 mars 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au glyphosate et aux préparations phytopharmaceutiques à base de cette substance active

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 28 janvier 2009 par la Direction générale de la santé et la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'avis relatif au glyphosate et aux préparations phytopharmaceutiques à base de cette substance active suite à la publication dans la revue scientifique "Chemical Research in Toxicology" d'un article intitulé "*Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells*" de Nora Benachour et Gilles-Eric Séralini, article paru le 23 décembre 2008 sur internet.

Il est demandé à l'Afssa d'analyser ces travaux afin de déterminer s'ils sont de nature à remettre en cause les autorisations accordées pour toutes les spécialités phytopharmaceutiques à base de glyphosate ou de modifier leurs conditions d'utilisation.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Produits phytosanitaires : substances et préparations chimiques", réuni les 24 et 25 mars 2009, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

CONTEXTE

Cet article fait suite à deux autres articles parus précédemment provenant de la même équipe^{1, 2} qui étudient *in vitro* les effets cytotoxiques du glyphosate et de préparations à base de cette substance active. Dans l'ensemble des articles, cette équipe traite des cellules en culture avec le glyphosate seul, son métabolite majeur l'AMPA³ et/ou l'une ou plusieurs de ses préparations.

Méthodologie

La toxicité du Glyphosate (G) (origine Sigma-Aldrich), du métabolite AMPA (origine Sigma-Aldrich), du formulant tensioactif POEA (amine de suif poly-éthoxylée⁴, fourni par le CNRS/Roscoff) et de 4 formulations de Roundup (origine Monsanto) achetées sur le marché (Roundup Express ou R7.5, Roundup Bioforce ou R360, Grands Travaux ou R400⁵ et Grands Travaux plus ou R450, contenant respectivement 7,2 g/L, 360 g/L, 400 g/L et 450 g/L de glyphosate), seuls ou en association, est testée sur 3 modèles cellulaires humains (lignée de cellules tumorales placentaires JEG3, lignée de cellules rénales embryonnaires 293 et cultures primaires de cellules endothéliales de la veine ombilicale HUVEC). Les paramètres mesurés sont la viabilité cellulaire (activité mitochondriale par le dosage de l'activité de la succinate déshydrogénase (SD) à l'aide du test MTT, atteinte membranaire par le dosage de l'adénylate kinase (AK) et apoptose par le dosage des caspases 3 et 7). Ces mesures sont complétées par un examen microscopique pour une analyse morphologique de l'apoptose (marquage DAPI).

¹ Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., and Séralini, G. E. (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 113, 716–720.

² Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., and Séralini, G. E. (2007) Time and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells and aromatase inhibition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 126–133.

³ AMPA : acide aminométhylphosphonique, métabolite trouvé dans les études de métabolisme dans le sol, l'eau, les végétaux et les animaux.

⁴ Polyéthoxylated tallowamine.

⁵ Préparation ne disposant plus actuellement d'autorisation de mise sur le marché.

Les produits testés sont mis en solution dans le milieu de culture sans sérum à la concentration de 1 ou 2 % qui sont, d'après les auteurs, les concentrations recommandées par le fabricant pour préparer les bouillies herbicides à appliquer. Le pH de la solution de glyphosate a été ajusté dans le milieu de culture à 5,8, équivalent à celui de la préparation Roundup Bioforce (360 g/L). Les cellules sont mises en contact pendant 24 heures en continu dans le milieu de culture sans sérum à diverses dilutions des solutions initiales.

Résultats

Selon les auteurs, les résultats montrent que :

- le glyphosate et les 4 formulations de Roundup induisent une mortalité cellulaire dans les 3 types cellulaires étudiés, avec *"une toxicité comparable pour chacun, mais à des concentrations différentes"* ;
- un effet du métabolite AMPA et du tensioactif POEA sur la mortalité cellulaire, via l'atteinte mitochondriale (SD) et membranaire (AK) ;
- un effet combiné du glyphosate, du métabolite AMPA ou du tensioactif POEA sur l'intégrité membranaire (combinaisons des composés 2 à 2 en retenant pour chacun la concentration maximale sans effet sur l'activité mitochondriale) ;
- l'induction par le glyphosate et le Roundup Bioforce (R360) d'une mortalité au moins en partie liée à une apoptose médiée par la voie des caspases.

Rappelant les résultats de leurs études antérieures sur le Roundup (effets sur la viabilité cellulaire et la synthèse des stéroïdes hormonaux, potentiel de bioaccumulation), les auteurs en concluent que :

- *"le niveau seuil d'action de l'herbicide doit prendre en compte la période et la durée d'exposition, la présence d'adjuvants, notamment le POEA, le métabolisme et la bioaccumulation ou les effets retardés dans le temps"* ;
- *"les effets ci-dessus sont démontrés en dessous des dilutions de l'herbicide recommandées en agriculture [...] les mélanges disponibles sur le marché peuvent endommager les cellules voire la mort cellulaire aux niveaux résiduels attendus, en particulier dans les denrées alimentaires"*.

AVIS DE L'AFSSA

Cette publication appelle plusieurs commentaires d'une part, d'ordre méthodologique et d'autre part, en termes d'interprétation des résultats.

Commentaires d'ordre méthodologique

Les lignées cellulaires employées présentent des caractéristiques qui peuvent être à l'origine d'un biais important dans l'interprétation des résultats :

- la lignée humaine JEG3 est une cellule cancéreuse provenant d'un choriocarcinome humain. Cette lignée est hypertriploïde et présente majoritairement 71 chromosomes (au lieu de 46 dans les cellules humaines). Outre les anomalies génomiques, cette lignée présente de nombreuses anomalies du génome telles que translocations, inversions et délétions : t(4;11)(p15;q13), i(13q), t(10p15q), del(18)(q21) ;
- la lignée de cellules humaines de rein 293 qui est une lignée transformée par un adénovirus 5. Il s'agit d'une cellule cancéreuse, elle est hypotriploïde et présente majoritairement 64 chromosomes (au lieu de 46 dans les cellules humaines), 4.2 % des cellules présentent une ploïdie supérieure. Outre les anomalies génomiques, cette lignée présente de nombreuses anomalies du génome : der(1)t(1;15) (q42;q13), der(19)t(3;19) (q12;q13), der(12)t(8;12) (q22;p13) ;
- la lignée appelée HUVEC (pour Human Umbilical Vein Endothelial Cells) n'est pas référencée à l'ATCC, elle est commercialisée par une société appelée LONZA. Il s'agit de cellules endothéliales provenant de veines ombilicales humaines. On ne dispose pas d'information sur ces cellules. Les cellules sont utilisées à un passage précoce (5 ou 6).

Pendant la phase d'exposition aux différents produits, les cellules sont maintenues en culture dans un milieu sans sérum ce qui peut conduire à perturber l'état physiologique des cellules. Une telle méthodologie pourrait être acceptable pour des traitements courts (3-4 heures) mais en aucun cas pour des traitements longs de 24 heures. De plus, le glyphosate utilisé dans l'étude est du glyphosate acide alors que dans les préparations testées il est sous forme de sel

d'isopropylamine. Le pH de la solution à la plus forte concentration a été ajusté dans le milieu de culture à 5,8. Pour les dilutions de la solution de glyphosate et des autres préparations testées, aucune précision n'est donnée sur le pH.

La publication ne mentionne aucun témoin positif notamment pour le test d'apoptose.

Commentaires sur les résultats

- 1 La cytotoxicité du glyphosate apparaît aux concentrations supérieures ou égales à 1 %, soit 3,6 g/L. tandis que l'AMPA n'est que très légèrement plus toxique sur les 3 types cellulaires, en prenant comme marqueur l'activité succinate deshydrogénase mitochondriale.

A ces niveaux de doses, on peut s'interroger sur l'impact du pH et des variations de pression osmotique sur la survie cellulaire.

- 2 Le glyphosate induit à forte dose de l'apoptose déterminée par l'activité caspase 3/7.

Ces résultats pourraient n'être pas spécifiques de l'effet du glyphosate mais dus à l'effet du pH et/ou à l'osmolalité qui induisent de l'apoptose comme cela a pu être montré dans une étude sur des cellules en culture (Meintières et Marzin, 2004⁶).

- 3 L'apoptose apparaît plus marquée sur les cellules HUVEC.

Les auteurs ne formulent aucune hypothèse pour expliquer cette observation.

- 4 Les préparations sont plus toxiques que le glyphosate administré à des doses équivalentes, mais cette augmentation de toxicité peut s'expliquer par l'effet du tensioactif POAE.

En raison des propriétés du tensioactif et de l'augmentation de l'osmolalité du milieu de culture, il est possible que les membranes cellulaires et celles des organites soient désorganisées. De plus, le tensioactif possède une toxicité propre par une action sur les membranes et favorise l'augmentation de la pénétration cellulaire par les constituants du mélange. De très nombreux agents tensioactifs présentent *in vitro* des effets cytotoxiques et inducteurs d'apoptose. C'est par exemple ce qu'a démontré Debbasch *et al.* (2001)⁷ avec le chlorure de benzalkonium, par ailleurs largement utilisé en usage local, cutané et oculaire pour la désinfection, sans que cela ne conduise à des effets toxiques inacceptables.

Enfin, concernant les associations AMPA+glyphosate+POEA, les résultats diffèrent d'une lignée à l'autre sans que l'on puisse en tirer des conclusions claires.

Conclusions

- 1 Les conclusions ne reposent que sur des expérimentations *in vitro* portant sur des modèles cellulaires non validés, non représentatifs (en particulier des lignées tumorales ou transformées) exposés directement à des concentrations de produits extrêmement élevées dans des conditions de culture ne respectant pas les conditions physiologiques cellulaires normales. Ces travaux ne mettent en lumière aucun nouveau mécanisme d'action du glyphosate et des préparations contenant du glyphosate.
- 2 Un large spectre d'études réglementaires de mutagenèse, de cancérogenèse, et de toxicité pour la reproduction visant à évaluer les effets du glyphosate a permis de définir une dose journalière admissible⁸ (DJA). Cette valeur de référence, fixée à 0,3 mg/kg de poids corporel

⁶ Apoptosis may contribute to false-positive results in the *in vitro* micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions. Meintières S. et Marzin D.. Mutation research. 2004 ; 560(2) : 101-18.

⁷ Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Mar;42(3):642-52.

⁸ DJA : La dose journalière admissible (DJA) d'un produit chimique est une estimation de la quantité de substance active présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de substance chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).

et par jour lors de l'évaluation européenne, est fondée sur une dose sans effet observé déduite d'une étude à long terme 2 ans par voie orale chez le rat à laquelle un facteur de sécurité de 100 a été appliqué pour prendre en compte l'extrapolation de l'animal à l'homme.

Dans le cadre des demandes de mise sur le marché, les préparations font également l'objet d'études spécifiques réglementaires qui permettent d'évaluer la toxicité des formulants et les effets cumulatifs potentiels de ces derniers avec la substance active.

L'évaluation prend en compte les effets des formulants, sur la base d'une évaluation des dangers et des risques en utilisant des doses de référence comme la DJA pour le consommateur et l'AOEL⁹ pour l'opérateur et l'exposition qui est estimée en se basant sur des modèles ou des données expérimentales.

- 3 Les formulations de Roundup apparaissent plus "actives" que le glyphosate sur les divers paramètres biologiques mais ce phénomène est également observé dans d'autres modèles cellulaires utilisés pour examiner le cycle cellulaire (œuf d'oursin) ou la synthèse des hormones stéroïdiennes (cellules tumorales de Leydig). De telles observations conduisent, à l'évidence, à mettre en cause l'effet des tensioactifs sur les membranes cellulaires et/ou mitochondriales, d'autant que plusieurs publications en démontrent les effets sur un grand nombre de paramètres biologiques. Il est donc hautement probable que l'exposition directe de cellules à ces formulants puisse expliquer l'ensemble des effets constatés dans toutes ces expérimentations *in vitro*.
- 4 Les auteurs sur-interprètent leurs résultats en matière de conséquences sanitaires potentielles pour l'homme, notamment fondées sur une extrapolation *in vitro-in vivo* non étayée. Compte tenu des facteurs limitants que représentent l'absorption orale (environ de 30 %), l'absorption cutanée (environ de 3 %), la cinétique d'élimination (présence de moins de 1 % de résidus tissulaires à 7 jours) mesurées dans les études de métabolisme du glyphosate, les teneurs mises en jeu dans ces expérimentations impliqueraient des expositions humaines au glyphosate considérables pour obtenir de tels effets cytotoxiques chez l'homme.

Au regard de ces éléments, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les effets cytotoxiques du glyphosate, de son métabolite AMPA, du tensioactif POAE et des préparations à base de glyphosate avancés dans cette publication n'apportent pas de nouveaux éléments pertinents qui soient de nature à remettre en cause les conclusions de l'évaluation européenne du glyphosate ni celles de l'évaluation nationale des préparations.

Pascale BRIAND

Mots-clés : glyphosate

⁹ AOEL : (Acceptable Operator Exposure Level ou niveaux acceptables d'exposition pour l'opérateur) est la quantité maximum de substance active à laquelle l'opérateur peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé.