

Commentaires concernant le travail de recherche

Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase
publié en 2005 par

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE,
dans la revue

Environmental Health Perspective

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257596/>

présentés par

Marc FELLOUS

INSERM U 709, Génomique et Epigénétique des Pathologies Placentaires, Université Paris 7
Président de la Commission du Génie Biomoléculaire

Daniel MARZIN

Laboratoire de Toxicologie, Institut Pasteur, Université Lille 2
Président de la Commission d'Etude de la Toxicité des Produits Antiparasitaires à Usage Agricole

Thierry MERCIER

Centre de Recherches de Versailles Grignon, INRA
Directeur de la Structure Scientifique Mixte

Luc MULTIGNER

INSERM U 625, Groupe d'Etudes de la Reproduction chez l'Homme et les Mammifères, Université Rennes 1
Membre du Comité d'Experts Spécialisé : Evaluation des Risques liés aux Substances Chimiques, AFSSE

**à la Mission d'Information sur les Enjeux des Essais et de l'Utilisation des Organismes
Génétiquement Modifiés**

23 mars 2005

AVANT-PROPOS

Pour certaines substances chimiques on dispose de nombreuses données toxicologiques, et parfois des études épidémiologiques, montrant que leur emploi ne présente pas de risque pour la santé. Néanmoins, et du au progrès de la science, il est parfaitement concevable que de nouvelles études toxicologiques pointent et/ou démontrent l'existence d'un nouveau danger qui n'avait pas été pris en considération auparavant et que des nouvelles études épidémiologiques soulèvent l'existence d'un risque (au sens épidémiologique ¹).

Afin de pouvoir établir les risques auxquels les populations pourraient être confrontés vis à vis d'un danger, des informations sur l'exposition sont indispensables. Dans la prise en considération du risque, des facteurs de sécurité sont appliqués qui conduisent à disposer de marges de sécurité acceptables.

Si la connaissance du danger, c'est à dire la reconnaissance d'un effet néfaste, est un préalable, l'identification de l'exposition est essentielle à l'évaluation du risque. La démarche scientifique exige que l'identification du danger soit rigoureuse et pertinente pour l'organe et l'espèce cible. De même, l'exposition doit être vraisemblable y compris dans des scénarii d'expositions maximalistes.

La publication du professeur G. Seralini conclue à l'identification d'un nouveau danger généré par l'herbicide glyphosate et par sa préparation commerciale Round Up et qui se caractérisé par un effet néfaste, assimilé à une perturbation endocrinienne, observé sur des cellules placentaires humaines. Ce danger pourrait expliquer, selon l'auteur, des anomalies de la reproduction décrites chez des populations exposées au glyphosate.

Cette publication, soulève des remarques majeures :

I. La lignée cellulaire employée est la JEG-3 issue d'un choriocarcinome ², un cancer issu du chorion, l'un des annexes embryonnaires et à ce titre elle diffère du trophoblaste placentaire normal ³. Les cellules JEG-3 ne constituent donc pas à proprement parler une lignée placentaire.

Le caractère tumoral de la lignée JEG-3 est confirmé par le caryotype tout à fait anormal pseudo triploïde, c'est-à-dire avec 3 copies (au lieu de 2) de la plupart des autosomes et de plus avec un seul chromosome sexuel X. Cette lignée comporte ainsi 70 chromosomes au lieu des 46 attendus, avec de plus 5 chromosomes tout à fait anormaux, très remaniés et inclassables. Ces anomalies chromosomiques font que toute observation biologique sur ce type cellulaire JEG-3 doit être analysée avec prudence. C'est en particulier le cas si l'on veut tirer des extrapolations générales à la situation *in vivo*.

La validation de ce travail nécessiterait donc d'utiliser non pas une seule lignée cellulaire mais plusieurs, qui sont disponibles dans les banques cellulaires internationales. De plus il est possible à partir de dissection fine des villosités placentaires de faire des cultures isolées de différents types cellulaires du placenta. C'est ce qui est fait très régulièrement à l'unité 709 de l'INSERM, spécialisée dans les pathologies du placenta et de la reproduction à l'Hôpital Cochin pour étudier certaines fonctions complexes du placenta humain. De plus, il aurait été souhaitable dans ce travail d'utiliser des lignées cellulaires contrôles, non-placentaires comme des lignées de fibroblastes humaines ou d'autre origine.

II. Les cellules JEG-3 sont exposées à des concentrations de glyphosate (seul ou avec la préparation Round Up) jusqu'à 7g /litre ⁴. Ces concentrations sont choisies par les auteurs du fait qu'elles sont similaires à celles utilisées en milieu agricole. Les effets néfastes observés par le Pr G. Seralini sont obtenus à des concentrations 100 fois inférieures à celles employées en milieu agricole, c'est à dire ~ 70 mg/litre. Sans tenir compte des facteurs de sécurité, pour que du glyphosate puisse être présent à une concentration de 70 mg/kg de poids corporel, cela supposerait, pour un individu de 70 kg l'ingestion par voie orale de 16,3 g de glyphosate, c'est à dire au minimum 2,3 litres de Round Up dans sa configuration à usage agricole ⁵.

Pour étayer le risque d'exposition des populations humaines par le glyphosate, les auteurs citent la publication de Acquavella et coll. ⁶ qui constate, auprès d'un échantillon d'agriculteurs, en contact professionnel avec du glyphosate, et de leurs familles, une charge corporelle maximum de 0.004 mg/kg de poids corporel. Sans préjuger des effets délétères éventuels d'un tel niveau d'exposition, ces concentrations sont sans commune mesure avec celles employées dans la publication du Pr G. Seralini et produisant un effet néfaste. A noter que la dose journalière admissible du glyphosate recommandée par l'Agence de Protection de l'Environnement des USA est de 2 mg/kg ⁷ de poids corporel et de 0.3 mg/kg de poids corporel pour l'Europe ⁸.

III. La question relative à l'impact des expositions au glyphosate sur la grossesse et le développement intra-utérin est soulevé dans la publication du Pr G Seralini en citant l'article publié par le groupe d'Arbuckle au Canada en 1997 ⁹ (et non pas en 2000 comme indiqué).

La plupart des études épidémiologiques qui ont abordé les effets néfastes des expositions au glyphosate sur la grossesse et le développement intra-utérin ont été réalisées par l'équipe d'Arbuckle dans le cadre de la cohorte intitulée *Ontario Farm Family Health Studies*. Dans la publication d'Arbuckle précédemment mentionnée, les auteurs notent une augmentation modérée de risque (au sens épidémiologique du terme) d'accouchements prématurés chez les épouses d'agriculteurs, ces derniers ayant été en contact professionnel 3 mois avant le début de la grossesse à une grande variété de pesticides incluant l'atrazine, le glyphosate, des organophosphorés, du 2,4-DB et des insecticides. Ce même groupe, dans une publication de 2001, observe que l'exposition pré-conceptionnelle au glyphosate entraîne une augmentation modérée, et à la limite de la signification statistique, du risque de fausses couches tardives ¹⁰ (OR : 1.7, intervalle de confiance à 95 % : 1.0 – 2.9) dans un modèle non ajusté à d'éventuels facteurs de confusion. Comme le soulignent les auteurs de ces travaux, il s'agit de démarches exploratoires avec de nombreuses limitations pour ce qui concerne la mesure des expositions (évaluation rétrospective des expositions par questionnaire et impossibilité de distinguer, parmi le grand nombre de molécules employées, laquelle ou lesquelles seraient responsable de l'effet observé). Les auteurs insistent, et avec raison, sur

la nécessité de poursuivre les études afin de préciser les molécules incriminées en utilisant des outils performants pour la mesure objective des expositions, en particulier par 'emploi de marqueurs biologiques validés d'exposition.

IV. La publication du Pr G. Seralini conclut à un effet de perturbation endocrinienne du glyphosate du fait d'une interaction avec l'aromatase, une enzyme clef dans le processus de synthèse des hormones stéroïdiennes. Le concept même de perturbateur endocrinien est particulièrement flou, ce qui explique le grand nombre de définitions existantes dans la littérature internationale ¹¹. Le Comité de la Prévention et de la Précaution cite, en s'inspirant de la littérature internationale, « les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous) population ¹². Un perturbateur endocrinien peut interférer avec la synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport, l'élimination ou l'action des hormones sexuelles ».

Si la problématique des perturbateurs endocriniens mobilise actuellement la communauté scientifique c'est parce que de nombreuses interrogations se posent quant aux conséquences que pourrait entraîner l'exposition des populations à des substances chimiques pouvant interagir avec le système hormonal. Ce questionnement est légitime. Toutefois, la communauté scientifique s'accorde actuellement pour constater que l'on manque encore de preuves expérimentales directes pour établir des liens de cause à effet entre certaines molécules suspectées d'être des perturbateurs endocriniens et la survenue d'atteintes chez l'Homme. L'incertitude provient, entre autre, par le manque de procédures standardisées et validées d'identification des perturbateurs endocriniens. Par conséquent, la simple interaction, qui plus est dans un système *in vitro*, d'une substance avec un récepteur, un enzyme ou un transporteur impliqué dans le système de régulation hormonale, ne suffit pas pour définir sans ambiguïté qu'il s'agit d'un perturbateur endocrinien et encore moins pour conclure que cela entraînera *de facto* un effet adverse chez l'Homme ou l'animal.

Le développement intra-utérin de l'embryon et du fœtus est particulièrement sensible aux xeno-biotiques environnementaux (pesticides, solvants, pollution atmosphérique, etc). De ce fait, de nombreuses études toxicologiques et épidémiologiques sont actuellement en cours de par le monde. En France, par exemple, plusieurs études coordonnées par l'INSERM et constituées de cohortes de femmes enceintes sont actuellement en cours pour identifier les facteurs de l'environnement (y compris les pesticides suspectés être des perturbateurs endocriniens) susceptibles de constituer des facteurs de risque d'issues de grossesse défavorables. Ces cohortes se caractérisent par des mesures biologiques d'expositions (qui intègrent l'ensemble des voies d'expositions) ce qui permettra, avec une plus grande confiance, d'infirmier ou d'affirmer l'existence d'un lien entre exposition et effet adverse.

NOTES

1. Probabilité de survenue d'un effet adverse, au sein d'une population déterminée, situé dans un environnement dangereux, pendant une période déterminée.

2. Les choriocarcinomes sont des tumeurs qui se développent ou bien à un stade précoce à partir de l'ectoderme de la blastula non embryonnée, sur un tératome, ou encore durant la grossesse à partir du chorion (une des deux annexes embryonnaires intimement accolées englobant le fœtus, le chorion et l'amnios).

3. Le placenta humain est en effet un organe complexe, d'origine embryonnaire, constitué de villosités dites «choriales»: unités structurales et fonctionnelles, où l'on retrouve un grand nombre de types cellulaires différents. Ce sont principalement *a*) à l'interface fœtus –maternelle, le trophoblaste (rôle endocrine, immunitaire, trophique). Le principal type cellulaire caractéristique est le cytotrophoblaste. À la bordure de la villosité, les cytotrophoblastes se différencient en syncytiotrophoblaste (bordant la villosité), en cytotrophoblastes d'ancrage (à l'utérus) et trophoblastes invasifs (de la paroi utérine et des vaisseaux utérins) ; *b*) Un réseau vasculaire : capillaires, vaisseaux villositaires, artères et veines chorioniques et vaisseaux ombilicaux, donc cellules endothéliales et musculaires lisses ; *c*) Des macrophages : cellules de Hofbauer, des fibroblastes. Les membranes fœtales tapissent la plaque chorionique du placenta et en dehors du site placentaire la cavité utérine. On retrouve de la cavité amniotique à l'utérus : l'amnios (cellules épithéliales et couche conjonctive), le chorion (une couche conjonctive et une couche trophoblastique). C'est de ce chorion qu'est issu le choriocarcinome dont est issue la

lignée JEG-3. Classiquement il était admis que ces cellules trophoblastiques du chorion n'étaient que des vestiges peu actifs des cellules trophoblastiques entourant à l'origine le blastocyste. Des études plus récentes indiquent une activité métabolique intense de ces cellules chorioniques. Toutefois les processus et les productions de substances peuvent différer de ceux observés dans le trophoblaste villositaire au site placentaire.

4. Solution à 2 % de Round Up contenant 360 g/litre de glyphosate.

5. 16.3 g de glyphosate = $[(70 \text{ kg} \times 70 \text{ mg/kg})/0.3]$ tenant compte de l'absorption intestinale du glyphosate de l'ordre de 30%. Pour une évaluation de risque dans le cadre de la Directive 91/414/CE, l'exposition calculée ou mesurée des opérateurs est comparée au NAEO (Niveau Acceptable d'Exposition pour l'Opérateur) qui tient compte de l'exposition par voie dermale et par inhalation. Dans le calcul de l'exposition systémique de l'opérateur, la dose externe reçue par l'opérateur et l'absorption par voie dermale de la substance formulée sont utilisées. Les nombreuses études in vitro et in vivo réalisées avec la préparation Round Up, non diluée ou à diverses dilutions, ou avec le glyphosate, ont montré un pourcentage d'absorption dermale inférieur ou égale à 3%. Ainsi, ce pourcentage doit être utilisé dans le calcul de l'exposition systémique de l'opérateur au glyphosate. Les calculs montrent que l'exposition externe par inhalation est très faible pour ce type d'usage, un pourcentage d'absorption par défaut de 100% est utilisé pour calculer l'exposition interne. Au niveau européen le NAEO du glyphosate est de 0.2 mg/kg de poids corporel par jour. Cf *Draft Guidance Document. Guidance for the setting of Acceptable Operator Exposure Level (AOELs)*, DG SANCO 7531/VI/95 rev.6. 10/09/2001 et note 8.

6. Acquavella JF et al. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect*, 112, 321-326, 2004.

7. US EPA, 1993. Glyphosate. Washington, DC

8. Review report for the active substance glyphosate ; European Commission, health and consumer protection directorate general, doc 6511/VI/99-final , 21 january 2002

9. Savitz DA et al. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol*, 1997, 146: 1025-1036.

10. Arbuckle TE et al. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspec.*, 2001, 109 : 851-857.

11. Parmi les plus fréquemment citées, figure celle issue de l'atelier européen de Weybridge en 1996 et reprise par l'IPCS (Programme international des Substances Chimiques): un perturbateur endocrinien est «une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations». Cette définition suppose que la substance ou le mélange en question est fait la preuve de son effet nocif. Comme cette démonstration n'existe que pour quelques rares substances, l'ICPS introduit la définition de perturbateur endocrinien «potentiel» comme «une substance ou un mélange exogène qui possède de propriétés qui pourraient conduire à une perturbation endocrinienne chez un organisme intact, ses descendants ou sous-populations». Selon l'atelier Smithsonian en 1997, un perturbateur endocrinien est «une substance exogène qui interfère avec la synthèse, sécrétion, transport, liaison, action ou élimination des hormones naturelles responsables de l'homéostasie, la reproduction, le développement ou le comportement».

12. CPP, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. Les perturbateurs endocriniens : quels risques ? Paris, 19 décembre 2003