

Traduction en français assurée par les auteurs- février 2007.

# **Une nouvelle analyse d'une étude avec des rats nourris d'un maïs génétiquement modifié révèle des signes de toxicité hépatorenale**

**Gilles-Eric Séralini<sup>1,2</sup>, Dominique Cellier<sup>2,3</sup>, Joël Spiroux de Vendomois<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Comité de Recherche et d'Information Indépendantes sur le Génie Génétique CRIIGEN, Paris, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie, Institut de Biologie, Université de Caen, France,

<sup>3</sup> Laboratoire d'Informatique, Traitement de l'Information et des Systèmes (LITIS), Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France,

Auteur correspondant : Prof Gilles-Eric Séralini, Université de Caen, CRIIGEN et Biochimie, Institut de Biologie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France. Telephone 02 31 56 56 84, fax 02 56 53 20. E-mail : [criigen@unicaen.fr](mailto:criigen@unicaen.fr).

## **Résumé**

L'évaluation du risque sur la santé des organismes génétiquement modifiés (OGM) cultivés pour l'alimentation humaine et animale fait débat à travers le monde, et très peu de données ont été publiées sur des études toxicologiques à moyen et long terme avec des mammifères. Une de ces études réalisée sous la responsabilité de la Compagnie Monsanto avec un maïs transgénique MON 863 a fait l'objet de questions de la part d'experts de comités d'autorisations en Europe, où il a été finalement approuvé en 2005. Cela a nécessité une nouvelle évaluation des résultats de pathologie rénale, et cela demeure l'objet de controverses. Une action en Cour d'Appel à Münster en Allemagne a permis au public d'accéder en juin 2005 à toutes les données brutes de cette étude de nutrition de rats durant 90 jours. Nous avons ré-analysé ces données de façon indépendante. Des statistiques

appropriées ont été ajoutées, comme une analyse multivariée des courbes de croissance, et pour les paramètres biochimiques des comparaisons entre les rats traités aux OGM et les témoins nourris avec un régime normal équivalent, et encore séparément entre les rats traités aux OGM et d'autres groupes « références » nourris avec six régimes de différentes compositions. Nous observons que la consommation des rats nourris au MON 863 a provoqué de légères variations de croissance significatives, différentes selon la dose et le sexe. Il y a une diminution de 3,3% du poids pour les mâles et une augmentation de 3,7% pour les femelles. Les mesures chimiques révèlent des signes de toxicité hépatorenale, marqués également par des sensibilités différentes chez les mâles et les femelles. Les triglycérides sanguins augmentent de 24 à 40% chez les femelles (soit à la semaine 14 pour la dose de 11% d'OGM ou à la semaine 5, pour la dose de 33%, respectivement) ; les excréments urinaires de phosphore et de sodium diminuent chez les mâles de 31 à 35% (semaine 14, dose 33%) pour les résultats les plus importants significativement reliés au traitement OGM en comparaison des 7 régimes testés. Des expériences plus longues seront essentielles pour indiquer la nature réelle et l'étendue de ces possibles pathologies ; avec les données présentes, il ne peut pas être conclu que le maïs transgénique MON 863 est un produit sain.

## **Introduction**

Très peu d'études ont été publiées avec des mammifères consommant à moyen et long terme des OGM approuvés et commercialisés, et administrés dans un régime équilibré, et comportant des mesures de nombreux paramètres sanguins et organiques (Domingo 2000, Meningaud *et al.* 2001), et seulement une étude a été réalisée dans de telles conditions avec le maïs MON863. Celle-ci a été conduite sous la responsabilité de la Compagnie Monsanto et récemment publiée après évaluation par les autorités (Hammond *et al.* 2006). Les

données brutes, tout d'abord gardées confidentielles, ont fait l'objet de questions d'experts des commissions d'évaluation en Europe, où le maïs a finalement été approuvé en 2005. Ces questions ont nécessité, en particulier, un nouvel examen des résultats de pathologie rénale. L'étude ayant été déclarée après coup comme apportant une assurance de sécurité pour cet OGM (Hammond *et al.* 2006), nous avons ré-analysé indépendamment les données brutes obtenues après un procès en Cour d'Appel. L'approbation par les autorités était basée sur le fait que toutes les différences significatives n'auraient pas de sens biologique. Pour tester cette hypothèse, nous avons voulu relier les différences significatives par organe et appliquer de nouvelles méthodes d'analyse. Ce maïs transgénique a été transformé pour produire dans ses cellules une nouvelle toxine insecticide artificielle, et à la séquence modifiée à partir de Cry3Bb1 (49-97 µg/g). Celle-ci a été exemptée d'études de toxicité subchronique *in vivo* (Hammond *et al.* 2006), et son mécanisme d'action n'est pas connu chez les mammifères, parce qu'elle n'a pas été testée seule; et le récepteur cible n'a pas été caractérisé précisément chez les insectes.

La plupart sinon tous les OGM commercialisés en plein champ contiennent des résidus de pesticides qu'ils tolèrent et/ou produisent (Clive 2006). Leur évaluation réglementaire ne nécessite pas 3 mois de tests avec 3 espèces de mammifères, puis un an avec un mammifère, et 2 ans sur un autre, comme il est fait pour les pesticides ou les médicaments. C'est pour cela qu'il apparaît crucial d'analyser très sérieusement les plus longs tests de toxicité disponibles uniquement sur une espèce de mammifère, au cours desquels de nombreux paramètres ont été mesurés sur 400 rats, selon des standards de l'OCDE (Organisation pour la Coopération Economique et le Développement), pendant 90 jours seulement. D'autres études indépendantes, avec des souris nourries durant 8 mois par un soja transgénique tolérant au Roundup ont été très détaillées, mais seulement au niveau de l'ultrastructure des cellules. Elles ont montré des anomalies de la transcription nucléaire

dans les hépatocytes pendant la consommation (Malatesta *et al.* 2002), dans le pancréas (Malatesta *et al.* 2003), et les testicules (Vecchio *et al.* 2004), et l'hypothèse a été émise que ces changements seraient dus aux effets toxiques de l'herbicide Roundup (Monsanto), sans doute similaires à ceux qui ont été observés sur des cellules de mammifères (Richard *et al.* 2005). Mais les paramètres mesurés dans les tests de toxicité les plus longs connus avec des mammifères consommant des OGM ne concernaient pas presque tous les organes et la chimie urinaire et sanguine, comme dans l'expérience présente.

## **Matériels et Méthodes**

### **Contexte Biologique : le protocole *in vivo* de Monsanto**

La Compagnie Monsanto revendique avoir suivi tous les standards de l'OCDE : cages individuelles, animaux répartis au hasard dans chaque groupe après une période de stabilisation d'une semaine, méthodes de mesures validées et standardisées, etc. Cette étude de nutrition a servi à autoriser le maïs MON 863 par les autorités européennes et américaines. Elle comprend des jeunes rats Sprague-Dawley (CrI:CD<sup>®</sup>(SD)IGS BR, Laboratoires Charles River, NY, âgés de 6 semaines environ) séparés en 10 groupes de 20 mâles et 10 de 20 femelles qui ont été analysés en détails (poids des organes et histologie). Mais les paramètres biochimiques ont été mesurés seulement pour la moitié d'entre eux à la semaine 5 et 14. Pour chaque sexe, 2 groupes ont été nourris avec des OGM, un groupe avec 11% de MON 863 et le second avec 33% dans un régime équilibré. Deux autres groupes, appelés dans cette étude « témoins », ont été nourris avec un régime contenant la lignée de maïs non OGM génétiquement la plus proche du MON 863, cultivée au même endroit (Hawaï), indiquée être équivalente en substance (Hammond *et al.* 2006) et ingérée dans des proportions semblables. La plante témoin la plus proche possible sera alors l'équivalent dit isogénique ou parental, la lignée étant non transformée et cultivée dans les

mêmes conditions. Ce témoin est appelé ici lignée LH82 x A634. Les 6 autres groupes de rats ont reçu des régimes sans OGM mais qui n'avaient pas la même composition chimique finale, même s'ils ont aussi atteints les caractéristiques PMI pour les régimes certifiés 5002 pour rongeurs. Ils contiennent tous 33% de lignées de maïs conventionnelles différentes (MON 847 Repl, Asgrow RX-770, LH235 x LH185, LH200 x LH172, B73Ht x LH82, Burrus BX-86). Celles-ci, appelés ici « références », n'ont pas été cultivées aux mêmes endroits (Illinois ou autres lieux à Hawaï), et elles n'ont pas été prouvées être substantiellement équivalentes à l'OGM MON 863 et au régime témoin, mais étaient censées mimer la variabilité des régimes réguliers de rats. D'autres détails ont été décrits (Hammond *et al.* 2006).

La modification génétique du maïs testé ici a été insérée par bombardement de particules au hasard dans le génome de cellules immatures de plantes. Cela peut provoquer des effets de mutagenèse insertionnelle, non directement visibles par l'analyse chimique du maïs ; cette dernière peut être seulement partiellement comparée entre OGM et non OGM, en testant une liste non exhaustive de substances, par exemple au cours de l'établissement de l'« équivalence en substance ». La construction génétique elle-même comprend un transgène (avec un promoteur 35S ubiquiste adapté) codant une toxine modifiée destinée à lutter contre un insecte coléoptère *Diabrotica*. Ce parasite dangereux a été probablement introduit plusieurs fois par avion en Europe à partir de la fin des années 1990 (Miller *et al.* 2005). Ce problème a été apparemment anticipé par les premiers essais aux champs du MON 863 ou d'OGM similaires en Europe. Ce maïs contient aussi un gène marqueur de la néomycine phosphotransférase II, codant une protéine d'antibiorésistance, pour faciliter la sélection des plantes transformées.

## Méthodes Statistiques

Les expériences présentes de nutrition ont été conçues et statistiquement évaluées par la Compagnie Monsanto (St Louis, US), mais les animaux ont été entretenus et analysés par le laboratoire Covance (Vienne, US).

Nous avons refait les analyses de Monsanto pour vérifier les statistiques descriptives (tailles des échantillons, moyennes, déviations standards) et l'ANOVA à un facteur par sexe et par variable. Pour cela, la normalité des résidus a été soumise au test de Shapiro et l'homoscédasticité (homogénéité des variances) au test de Bartlett. Dans le cas où les tests de Shapiro et Bartlett étaient non significatifs (\* $p > 0,05$  et \*\* $p > 0,01$  respectivement) nous avons mis en œuvre une ANOVA, et dans le cas d'hétéroscédasticité la méthode d'approximation de Welch. Dans le cas où le test de Shapiro était significatif, nous avons utilisé le test basé sur la somme des rangs de Kruskal-Wallis.

De plus, nous avons entrepris une analyse multivariée des courbes de croissance et de consommation des rats. Pour les croissances, après une régression linéaire, l'augmentation hebdomadaire relative a pu être considérée comme proportionnelle au logarithme du poids, et nous avons donc utilisé un modèle de Gompertz (Ratkowsky 1990, Huet *et al.* 2004),

$$Y = a \exp(-\exp(-b(X-c))).$$

Le paramètre  $a$  représente ici le sommet de la courbe,  $b$  est relié au taux de croissance et  $c$  est un paramètre de position avec l'axe des  $X$ . Ces paramètres ont été estimés par régression non linéaire. De manière à étudier si les courbes de croissance sont significativement différentes, nous avons comparé les modèles en testant l'hypothèse nulle (qui donnerait les mêmes courbes avec des paramètres identiques pour les deux groupes) contre l'hypothèse alternative (différentes courbes). Pour cela, nous avons utilisé le test  $F$  afin de comparer la somme des erreurs quadratiques sous les deux hypothèses. Le critère

d'information de Akaike (AIC, Akaike 1974) a été aussi utilisé pour évaluer la probabilité que les courbes soient différentes.

Nous avons ensuite analysé les effets des OGM pour chaque sexe et chaque régime, paramètre par paramètre, entre les rats nourris aux OGM et le groupe témoin, et ensuite seulement avec les groupes références. Afin de sélectionner le test de comparaison bilatéral approprié (Crawley 2005), nous avons d'abord étudié la normalité (test de Shapiro) et l'égalité de la variance (F test). Selon les résultats, nous avons mis en œuvre le test le plus adapté, i.e. un test de Student non apparié, un test de Student avec correction de Welch ou un test non paramétrique de Mann-Whitney (qui est généralement plus approprié avec des échantillons de taille 10).

Nous avons utilisé le langage R (Crawley 1995) version 2.2.1 pour les calculs statistiques (Comprehensive R Archive Network, CRAN - <http://cran.r-project.org>), sauf pour les courbes de croissance des rats, pour lesquelles des régressions non linéaires ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism (version 4.02 pour Windows, GraphPad Software, San Diego Californie USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## Résultats

Nous avons d'abord vérifié toutes les données brutes, et nous avons constaté une concordance entre nos valeurs calculées et celles publiées par Hammond *et al.* (2006) de la Compagnie Monsanto, pour les statistiques descriptives (tailles des échantillons, moyennes, déviations standards) et ANOVA à un facteur par sexe et par variable.

### Poids des corps

Notre étude a consisté en une analyse multivariée des courbes de croissance et de consommation des rats pour les quatre groupes recevant des OGM ou des régimes témoins équivalents. Si la consommation animale n'a pas été notablement changée, il apparaît que les courbes de croissance pour les deux témoins de chaque sexe (11% et 33% de la lignée témoin) sont superposées, tandis que les nourritures aux OGM provoquent des différences de croissance (Fig.1). Les groupes à 11% d'OGM sont toujours inférieurs aux groupes à 33% dans les deux sexes. Tous les mâles traités aux OGM croissent moins que les témoins à partir de la semaine 2, et toutes les femelles plus. Cet effet lié au sexe et à la dose résulte du fait que les courbes de croissance chez les mâles OGM 11% sont très significativement inférieures à celles de leurs témoins, et supérieures pour les femelles OGM 33%. (Table 1). Toutes les valeurs de p pour les différents groupes comparés aux témoins sont  $< 0,01$ . Ceci résulte en une diminution de 3,3 % du poids pour les mâles et une augmentation de 3,7 % pour les femelles.

### Autres paramètres

Nous avons tout d'abord étudié la comparaison des effets des OGM sur la physiologie des rats, par rapport aux témoins nourris avec une lignée de maïs isogénique, non transgénique, équivalente (Table 2), et ensuite les effets de différents maïs non équivalents en compositions (6 groupes références différents *versus* les témoins). Finalement nous avons étudié les effets des OGM *versus* tous les régimes différents (double encadré, Table 2). Au

total 58 paramètres biochimiques reflétant la plupart des fonctions physiologiques ont été mesurés 2 fois (semaines 5 et 14), en particulier pour le sérum et l'urine, et les paramètres hématologiques. Les poids des organes et les différences relatives ont été ajoutés. Nous avons réalisé au total 494 comparaisons : 40 différences (8%) sont statistiquement significatives (\* $p < 0,05$ ); 25 auraient été attendues sous l'hypothèse nulle d'absence de différences entre les régimes OGM et les régimes témoins. Parmi les 40 différences significatives, nous en avons retenu seulement 33 dont la différence relative des moyennes est  $\geq \pm 5\%$  par rapport aux témoins. Cela a probablement exclu les différences potentiellement incidentes s'il y en avait. La Table 2 résume seulement la liste des paramètres significativement perturbés au moins pour un sexe et pour un traitement, et montre aussi le pourcentage des variations relatives des moyennes. La même Table 2 est aussi obtenue si nous utilisons systématiquement le test de Mann-Whitney pour tous les paramètres biologiques, sauf pour l'albumine à la semaine 14, femelles 11% (14-f11%), le phosphore urinaire (5-m33%) et l'azote de l'urée (4-f11%) ; les valeurs de  $p$  dans ce cas sont comprises entre 6,3 et 10,6%; ces paramètres n'ont plus été pris en compte par la suite. La Table 3 correspond aux valeurs physiologiques des paramètres significativement perturbés chez les rats nourris aux OGM, en comparaison de leurs témoins correspondants. Elle met en évidence la quantité impressionnante d'anomalies.

La Table 2 indique que les variations liées aux OGM, en comparaison des témoins, ont été concentrées surtout sur 5 paramètres hépatiques chez les mâles, et 9 chez les femelles, puis respectivement sur 9 et 4 paramètres rénaux chez les mâles et les femelles, par rapport à l'ensemble des organes étudiés. Nous avons alors mesuré les variations significatives entre les 6 groupes de références et les témoins (mais isogénique à l'OGM), ce qui permet d'étudier les effets potentiels de la composition du régime seule. Les paramètres qui ont aussi été perturbés dans ce cas ont été déduits des premiers, et encore 3 et 5 paramètres

hépatiques et 7 et 1 paramètres rénaux au moins apparaissent alors liés spécifiquement au régime OGM. Nous avons ensuite comparé les paramètres des rats nourris aux OGM aux 6 groupes références, en ciblant sur les différences plus importantes avec les OGM qu'avec n'importe quel autre régime. Il est toujours ressorti pour les mâles et les femelles respectivement 4 et 0 paramètres rénaux et 1 et 2 paramètres hépatiques qui sont restés significativement différents dans tous les cas.

Les changements hépatiques significatifs chez les rats nourris de 11% d'OGM qui ont le plus faible taux de croissance sont une diminution des protéines sériques totales (de 5%), certainement due en partie à une diminution en globuline (12%). Chez les femelles, les triglycérides ont été spécifiquement augmentés chez les groupes d'animaux traités aux OGM qui avaient des foies et des poids au-dessus de la normale. En fait, les triglycérides ont augmenté de 24-40% chez les femelles nourries aux OGM (soit à la semaine 14, dose 11%, ou à la semaine 5, dose 33%, respectivement).

Au niveau rénal, les phénomènes correspondent à des chutes en excrétions de phosphore et de sodium urinaires chez les mâles, de 31-35% (semaine 14, dose 33%) pour les résultats les plus importants liés au traitement OGM, en comparaison des 7 régimes testés, tandis que les autres régimes augmentaient plutôt l'excrétion de sodium dans certains cas (données non fournies).

De plus, pour les mâles, aucun des paramètres changés significativement par l'OGM ne l'étaient de la même manière par les autres régimes. Les effets de l'OGM correspondent à une diminution des poids des reins dans ce groupe.

D'autres effets sporadiques de l'OGM sur le glucose sérique, l'excrétion de chlore urinaire ou les réticulocytes, variables selon le sexe ou la dose, sont visibles.

## Discussion

L'analyse statistique utilisée pour conclure sur l'innocuité du maïs OGM par Hammond *et al.* (2006) a d'abord seulement été réalisée pour cette expérience par le centre d'études statistiques de Monsanto. Son but est d'étudier les effets toxicologiques possibles de l'introduction de la construction génétique produisant un insecticide dans le maïs, ainsi il devrait être garanti que les seules sources de variabilité dans ces résultats sont liées à la présence du transgène, et en dehors des effets dus au hasard. En un sens, l'adjonction des 6 groupes de références nourris avec d'autres variétés commerciales de maïs, qui ne sont pas substantiellement équivalentes (avec plus ou moins de sels ou de sucres...), introduit l'étude simultanée d'autres paramètres. De plus, les groupes de références comprennent au total 60 rats par sexe, qui sont mesurés pour leurs paramètres biologiques, et ceux-ci sont comparés à seulement 10 rats nourris avec 33% d'OGM par Monsanto. Nous pensons que cette différence de taille des groupes favorise les incertitudes. Nous avons donc préféré séparer les analyses entre les groupes nourris aux OGM et les témoins, dans un premier temps, et ensuite comparer les groupes OGM aux groupes références (puis les références aux témoins), au contraire de l'analyse de Monsanto.

De plus, une étude avec 20 animaux par groupe a déjà un pouvoir de discrimination limité, en conséquence nous pouvons considérer qu'il y a des effets toxiques possibles plus facilement si plusieurs paramètres sont perturbés pour un même organe d'une manière non négligeable. Malheureusement, à part les témoins et les références, seulement 40 rats par sexe ont reçu des OGM sur un total de 400 animaux dans cette étude, et uniquement la moitié d'entre eux a été analysée pour des paramètres biochimiques, i.e. 10 par dose et par sexe après 5 et 14 semaines, comme il a été indiqué.

Les variations de poids des corps, habituellement difficilement modifiés par un régime normal équilibré avec très peu de toxines, représentent un facteur important à suivre. Cette

étude a été absente du rapport statistique de Monsanto. Les variations significatives de ce facteur n'ont pas été étudiées par Hammond *et al.* 2006, alors que les mâles nourris de 11% d'OGM forment la courbe la plus basse de tous les groupes après la deuxième semaine. Cependant, nous avons clairement prouvé des différences très significatives de croissance à la fois pour les mâles et les femelles, avec un effet moindre du régime à 11% en comparaison du régime à 33% d'OGM, et des témoins. Il y a eu une augmentation des poids au-dessus des témoins avec le régime 33%, et sous les témoins avec le régime à 11% donné aux mâles. Ceci n'est pas seulement une indication de dysfonctionnement de plusieurs organes mise en évidence dans la Table 3, mais aussi d'un effet dépendant du sexe relié sans doute à une perturbation hormonale et/ou à des différences de métabolisme hormonal. De manière surprenante, les hormones sexuelles n'ont pas été mesurées dans ces études réglementaires, leurs modifications auraient pu expliquer certaines observations.

En fait, les résultats de la Table 2 concordent avec des signes de toxicité hépatorénale possible, avec une sensibilité plus importante des reins chez les mâles et des foies chez les femelles. Une sensibilité différentielle selon le sexe pour les toxiques est courante, la détoxicification hépatique étant hormono-dépendante par exemple.

Des différences sont significatives avec les OGM même si les régimes de références ont des effets spécifiques différents : comme 8-23% de différences dans le taux d'alkaline phosphatase hépatique, ou dans les activités aspartate aminotransférases, ou encore des petites variations dans les échanges de chlorure de sodium et de volume urinaires, probablement dues à des concentrations variables en lipides ou en sels dans les régimes (données non fournies).

Les effets liés aux OGM sont illustrés à un niveau hépatique par une perturbation du métabolisme des protéines et des triglycérides. Il est connu que certains hépatotoxiques, comme le métabolite du produit chimique hydrazine, peuvent causer une nécrose du foie et

une stéatose avec hypertriglycémie dans le sang (Sarich *et al.* 1996). Ces changements peuvent avoir des seuils d'apparitions différentiels selon le sexe ou l'état hormonal, comme on le sait pour des réactions classiques aux hépatocarcinogènes (Castelli *et al.* 1986, Pitot *et al.* 1989). De plus, rien dans le protocole ne permet de penser que les proportions de 11 ou 33% d'OGM choisies dans les régimes s'inscrivent dans la portion linéaire d'une courbe dose-réponse, après l'intoxication par une protéine Bt, par exemple. Certaines toxines Bt peuvent causer une hépatotoxicité humaine par un mécanisme non apoptotique . (Ito *et al.* 2004), ou une peroxydation des lipides hépatiques chez les rats (Shaban *et al.* 2003). Cependant, il devrait être souligné qu'un effet métabolique pléiotropique dû à une mutagenèse insertionnelle et indépendant du nouvel insecticide produit dans l'OGM ne peut être exclu.

Pour interpréter les données rénales, nous n'avons pas eu accès aux coupes histologiques des reins après l'action en Cour d'Appel, mais Hammond *et al.* (2006) de Monsanto ont publié qu'il y avait de petites augmentations d'inflammations localisées, et des signes de régénérations tubulaires dans le groupe aux OGM en comparaison des témoins. Ils ont fait des commentaires sur une petite diminution des chlorures sériques. Après des questions des comités d'évaluations en Europe, deux experts certifiés en pathologies, qui avaient été proposés par Monsanto et qui ont réexaminé les coupes, ont conclu à une néphropathie progressive chronique classique, à laquelle les rats mâles sont sensibles (Hard et Khan 2004). Celle-ci a une incidence de 18/20 dans le groupe des mâles nourris au MON 863, plus forte que chez les témoins (14/20), même si cela n'a pas été considéré comme pertinent par Hammond *et al.* 2006. Si toutes les données sont considérées dans leur ensemble, et surtout au vu des paramètres de chimie urinaire spécifiquement perturbés aux semaines 5 et 14 (Table 2), lesquels ne sont pas communiqués par Hammond *et al.* (2006),

il peut être conclu qu'une toxicité rénale liée aux OGM chez les mâles est observée dans ce travail.

Pour expliquer les résultats sporadiques observés dans le sang, nous avons très peu de données. Cependant, il est connu dans certaines études que les toxines Bt peuvent aussi perforer des cellules sanguines (Rani et Balaraman 1996).

En conclusion, les deux organes de détoxification majeurs, le foie et le rein, ont été perturbés dans cette étude. Il apparaît que les méthodes statistiques utilisées par Monsanto n'étaient pas assez détaillées pour constater les perturbations biochimiques, et ce de manière à mettre en évidence des signes possibles de pathologies pendant une étude de 14 semaines seulement. De plus, le protocole expérimental pourrait avoir été accompli de manière plus efficace pour étudier la toxicité subchronique, en particulier avec plus de rats nourris aux OGM en comparaison des autres groupes. En considérant que les populations humaines et animales peuvent être exposées à des niveaux comparables de ce type d'alimentation qui a été autorisé dans plusieurs pays, et que ces tests sont les meilleurs tests de toxicité disponibles chez les mammifères, nous recommandons fortement une nouvelle évaluation et des expositions plus longues des mammifères à ces régimes, avec des observations cliniques minutieuses, avant de pouvoir conclure que le MON 863 est propre à la consommation.

## **Remerciements**

Nous remercions Anne-Laure Afchain pour son aide à l'analyse statistique, et les conseils scientifique et d'administration du CRIIGEN, pour l'expertise, et l'initiation des actions en justice par l'ancienne ministre française de l'environnement Corinne Lepage, afin d'obtenir les données. Nous remercions aussi Frédérique Baudoin pour le secrétariat, et le Dr Brian John et Ian Panton pour leurs conseils dans la révision en anglais du manuscrit.

Ce travail a été supporté par Greenpeace Allemagne qui, en juin 2005, a gagné le procès en Cour d'Appel contre Monsanto, compagnie qui voulait garder les données confidentielles. Nous remercions le ministre français de la recherche et le député parlementaire François Grosdidier pour un contrat d'étude sur l'évaluation des risques sanitaires des OGM. Nous sommes grés à la Direction Qualité, Responsabilité et Gestion des Risques du groupe Carrefour pour leur soutien.

## Références

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Control* 19:716-723
- Castelli D, Seralini GE, Lafaurie M, Stora C (1986) Ovarian function during aflatoxin B<sub>1</sub>-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 53:183-194
- Clive J (2006) Global status of biotech/GM crops. *ISAAA Briefs* 35:1
- Crawley MJ (2005) *Statistics: an introduction using R*. Wiley, London
- Domingo JL (2000) Health risks of GM foods : many opinions but few data. *Science* 288:1748-1749
- Hammond B, Lemen J, Dudek R, Ward D, Jiang C, Nemeth M, Burns J (2006) Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected corn. *Food Chem. Toxicol* 44:147-160
- Hard GC, Khan KN (2004) A contemporary overview of chronic progressive nephropathy in the laboratory rat, and its significance for human risk assessment. *Toxicol. Pathol.* 32:171-180
- Huet S, Bouvier A, Poursat MA, Jolivet E (2004) *Statistical tools for nonlinear regression*. Springer-Verlag, New York
- Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Mizuki E, Akao T, Ohba M (2004) Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* 279:21282-21286
- Malatesta M, Biggiogera M, Manuali F, Rocchi MB, Baldelli B, Gazzanelli G (2003) Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Eur. J. Histochem.* 47:385-388

- Malatesta M, Caporaloni C, Gavaudan S, Rocchi MB, Serafini S, Tiberi C, Gazzanelli G (2002) Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Cell Struct. Function* 27:173-180
- Meningaud JP, Moutel G, Herve C (2001) Ethical acceptability, health policy and foods biotechnology based foods : is there a third way between the precaution principle and on overly enthusiastic dissemination of GMO ? *Med. Law* 20:133-141
- Miller N, Estoup A, Toepfer S, Bourguet D, Lapchin L, Derridj S, Kim KS, Reynaud P, Furlan L, Guillemaud T (2005) Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* 310:992
- Pitot HC, Campbell HA, Maronpot R, Bawa N, Rizvi TA, Xu YH, Sargent L, Dragan Y, Pyron M (1989) Critical parameters in the quantitation of the stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.* 17:594-612
- Rani SS, Balaraman K (1996) Effect of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* on human erythrocytes in vitro. *Indian J. Exp. Biol.* 34:1241-1244
- Ratkowsky DA (1990) *Handbook of non linear regression models*. Dekker, New York
- Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 113:716-720
- Sarich TC, Youssefi M, Zhou T, Adams SP, Wall RA, Wright JM (1996) Role of hydrazine in the mechanism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. *Arch. Toxicol.* 70:835-840
- Shaban NZ, Helmy MH, El-Kersh MA, Mahmoud BF (2003) Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats

given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 135:405-414

Vecchio L, Cisterna B, Malatesta M, Martin TE, Biggiogera M (2004) Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. *Eur. J. Histochem.* 48:449-454

### **Table 1. Différences statistiques entre les courbes d'évolution des poids.**

Les estimations des paramètres pour les modèles de Gompertz ont été calculées (a) pour les paramètres (Par.) a, b et c et le F test de comparaison de modèles effectué (b, test F colonne 2) avec les valeurs des probabilités critiques p et des statistiques F. Les Critères d'information d' Akaike (AIC) et les probabilités (Prob.) de différences (Diff.) des courbes sont précisées (b, colonne 3).

### **Table 2. Différences entre les rats nourris aux OGM et les témoins.**

Les effets des OGM sont indiqués pour chaque paramètre par les différences relatives (%) à la moyenne du groupe témoin correspondant par sexe et par dose. Les différences significatives par rapport aux témoins sont présentées (\*p<0,05, \*\*p<0,01), pour tous les paramètres mesurés dans cette étude de nutrition subchronique. Les paramètres ont été groupés par organes, selon les sites de synthèses ou s'ils sont des indicateurs classiques de dysfonctionnement d'un organe. Ils ont été indiqués pour tous les groupes seulement s'il y avait des différences statistiques significatives pour un sexe ou un régime ainsi qu'une différence relative à la moyenne  $\geq \pm 5\%$ . Les animaux étaient des rats jeunes adultes mâles (m) ou femelles (f) nourris pendant 5 ou 14 semaines avec l'OGM (MON 863, 11 ou 33% dans le régime) et comparés avec les témoins nourris avec une lignée de maïs isogénique « substantiellement équivalente » (LH82 x A634) qui a été cultivée dans la même

localisation (à Hawaï). Les paramètres ont été mesurés pour 10 rats, excepté pour les poids des organes, (20 rats) qui ont été obtenus seulement à la fin de l'expérience.

En simple encadré, nous avons indiqué les différences statistiques significatives entre les rats nourris aux OGM et les contrôles qui ne le sont pas entre la moyenne des six groupes de référence et les témoins. Une différence entre les groupes références et témoins pourrait indiquer un effet du régime à base de la lignée isogénique par lui-même. En double encadré, parmi les effets dus à l'OGM sont indiquées les différences statistiques entre les groupes OGM et la moyenne des 6 groupes de références (qui n'ont même pas mangé un régime de même composition que les témoins).

### **Table 3. Effets des traitements OGM classés par organes.**

A partir de la Table 2, tous les paramètres significativement différents entre les rats nourris aux OGM et les témoins correspondant sont représentés par leur moyenne brute  $\pm$  SEM dans les unités correspondantes précisées. Les différences ont toujours été significatives par rapport aux témoins selon qu'il y avait une ou deux étoiles dans la Table 2 ( $p < 0,05$  ou  $< 0,01$ ). Les témoins sont soumis à un régime fait avec un maïs isogénique substantiellement équivalent, et toutes les autres conditions (génétique, température, lumière, espace ou conditionnement dans les cages...) sont identiques. Le temps d'exposition aux régimes (5 et 14 semaines correspondant respectivement à 4 et 13 semaines de nourriture OGM véritable), mais aussi les sexes (mâles m, femelles f), et les doses (11 ou 33% de maïs GM Bt MON 863 dans la nourriture équilibrée) sont précisés.

**a**

<b>Gompertz models for males</b>			
<b>Par.</b>	<b>Control 11%</b>	<b>GMO 11%</b>	<b>One model</b>
<b>a</b>	<b>533,6</b>	<b>524,6</b>	<b>528,8</b>
<b>b</b>	<b>0,2240</b>	<b>0,2011</b>	<b>0,2126</b>
<b>c</b>	<b>0,1251</b>	<b>-0,0939</b>	<b>0,0185</b>
<b>Gompertz models for females</b>			
	<b>Control 33%</b>	<b>GMO 33%</b>	<b>One model</b>
<b>a</b>	<b>286,1</b>	<b>300,1</b>	<b>292,9</b>
<b>b</b>	<b>0,2272</b>	<b>0,2016</b>	<b>0,2142</b>
<b>c</b>	<b>-1,185</b>	<b>-1,376</b>	<b>-1,282</b>

**b**

<b>sex</b>	<b>F test</b>	<b>AIC</b>
<b>males</b>	<b>p &lt; 0.0001</b> <b>F = 11.73</b>	<b>Prob. &gt; 99.99 %</b> <b>Diff. 28.34</b>
<b>females</b>	<b>p = 0.0032</b> <b>F = 4.66</b>	<b>Prob. = 98.04 %</b> <b>Diff. 7.83</b>

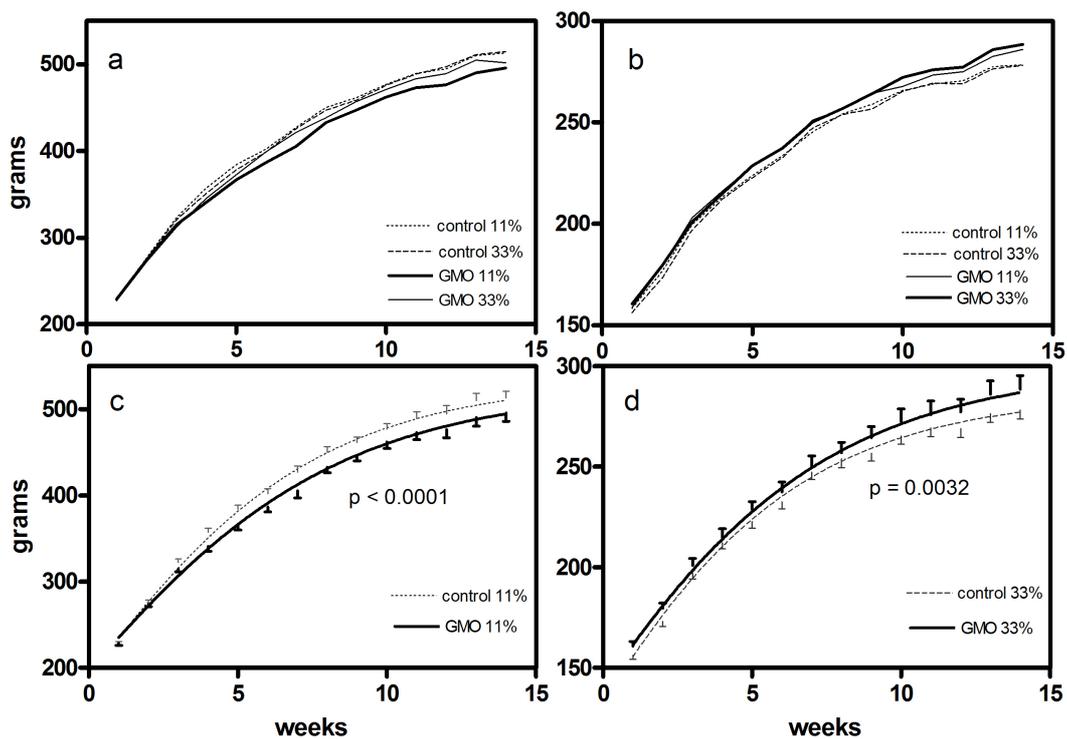
**Table 1**

<u>Liver parameters</u>	week	m 11%	m 33%	f 11%	f 33%
Albumin / Globulin Ratio	5	11*	-3	-9	4
Albumin / Globulin Ratio	14	6	-2	-18**	7
Albumin	5	-3	-2	-2	5*
Albumin	14	-2	3	-6*	5
Globulin	5	-12*	2	9*	1
Globulin	14	-8	7	15*	-2
Alanine Aminotransferase	14	-30*	-8	37	4
Total Protein	14	-5*	5*	1	3
Triglycerides	5	22	-2	-11	40**
Triglycerides	14	15	-1	24*	6
Liver Weight	14	-1	-2	7**	6
Liver / Brain Ratio	14	-1	-3	6*	4
<u>Kidney parameters</u>					
Creatinin	14	-7	13*	13*	-2
Urine Sodium	14	-23	-25*	11	-26
Urine Sodium Excretion	14	3	-35*	35	-24
Urine Chloride Excretion	5	35	3	50*	67*
Urine Potassium	5	35*	-20	-3	-13
Urine Phosphorus	5	3	-35*	24	-15
Urine Phosphorus	14	-34	-31*	12	-8
Urea Nitrogen	14	-8	4	17*	-1
Kidney Weight	14	-3	-7*	3	2
Kidney / Brain Ratio	14	-3	-7*	1	1
Kidney % Body Weight	14	-1	-5*	-1	-1
<u>Pancreas</u>					
Glucose	14	-4	9	9*	10**
<u>Bone marrow</u>					
Neutrophils	5	5	22*	-14	3
Eosinophils	14	32	54*	20	0
Reticulocytes	14	15	-17	-35	-52*
Reticulocytes % RBC	14	16	-16	-36	-55*

Table 2

parameters	week	sex	dose	control	GMO	units
				mean ± sem	mean ± sem	
<b><u>Liver parameters</u></b>						
Albumin / Globulin Ratio	5	m	11%	1.782 ± 0.053	1.974 ± 0.043	ratio
Albumin / Globulin Ratio	14	f	11%	2.334 ± 0.085	1.914 ± 0.083	ratio
Albumin	5	f	33%	4.600 ± 0.054	4.850 ± 0.056	g/dl
Albumin	14	f	11%	5.130 ± 0.104	4.830 ± 0.091	g/dl
Globulin	5	m	11%	2.450 ± 0.090	2.150 ± 0.072	g/dl
Globulin	5	f	11%	2.110 ± 0.041	2.300 ± 0.080	g/dl
Globulin	14	f	11%	2.220 ± 0.080	2.560 ± 0.097	g/dl
Alanine Aminotransferase	14	m	11%	67.100 ± 11.078	47.300 ± 1.422	u/l
Total Protein	14	m	11%	7.140 ± 0.092	6.810 ± 0.099	g/dl
Total Protein	14	m	33%	6.860 ± 0.090	7.1778 ± 0.112	g/dl
Triglycerides	5	f	33%	39.300 ± 1.578	54.900 ± 3.743	mg/dl
Triglycerides	14	f	11%	40.900 ± 3.889	50.900 ± 2.479	mg/dl
Liver Weight	14	f	11%	7.250 ± 0.116	7.789 ± 0.163	g
Liver / Brain Ratio	14	f	11%	3.664 ± 0.059	3.890 ± 0.085	ratio
<b><u>Kidney parameters</u></b>						
Creatinin	14	m	33%	0.520 ± 0.013	0.589 ± 0.031	mg/dl
Creatinin	14	f	11%	0.560 ± 0.016	0.630 ± 0.021	mg/dl
Urine Sodium	14	m	33%	26.980 ± 3.487	20.122 ± 5.699	meq/l
Urine Sodium Excretion	14	m	33%	0.290 ± 0.028	0.189 ± 0.020	meq/time
Urine Chloride Excretion	5	f	11%	0.220 ± 0.025	0.330 ± 0.042	meq/time
Urine Chloride Excretion	5	f	33%	0.150 ± 0.022	0.250 ± 0.037	meq/time
Urine Potassium	5	m	11%	112.210 ± 13.860	151.000 ± 10.039	meq/l
Urine Phosphorus	5	m	33%	166.970 ± 24.719	108.310 ± 7.922	mg/dl
Urine Phosphorus	14	m	33%	119.120 ± 13.479	81.822 ± 10.468	mg/dl
Urea Nitrogen	14	f	11%	13.200 ± 0.742	15.500 ± 0.792	mg/dl
Kidney Weight	14	m	33%	3.446 ± 0.070	3.201 ± 0.078	g
Kidney / Brain Ratio	14	m	33%	1.600 ± 0.030	1.483 ± 0.034	ratio
Kidney % Body Weight	14	m	33%	0.705 ± 0.015	0.667 ± 0.009	%
<b><u>Pancreas</u></b>						
Glucose	14	f	11%	103.300 ± 2.495	112.600 ± 3.497	mg/dl
Glucose	14	f	33%	105.300 ± 2.432	115.800 ± 2.476	mg/dl
<b><u>Bone marrow</u></b>						
Neutrophils	5	m	33%	0.860 ± 0.058	1.050 ± 0.054	×10 <sup>3</sup> /μl
Eosinophils	14	m	33%	0.130 ± 0.015	0.200 ± 0.024	×10 <sup>3</sup> /μl
Reticulocytes	14	f	33%	0.085 ± 0.015	0.041 ± 0.008	×10 <sup>6</sup> /μl
Reticulocytes % RBC	14	f	33%	1.040 ± 0.201	0.470 ± 0.092	%

Table 3



**Fig. 1**

**Figure 1. Croissance du poids corporel chez les mâles (a, c) et les femelles (b, d) durant 14 semaines.**

Les courbes expérimentales (a, b) et les courbes théoriques correspondantes calculées selon les modèles de Gompertz (c, d) sont présentées. Les effets les plus importants pour chaque sexe sont en gras et sont statistiquement différents des témoins (voir méthodes).