

**Accueil d'Ouverture des Journées**

**Docteur Patrick TOUBON** : Président QUALIBIO  
**Professeur Edmond-Antoine DECAMPS** : Université de Rennes

- QUALIBIO -

Mesdames, Messieurs,

C'est un grand honneur de pouvoir vous accueillir, au nom de tous les membres des Comités, pour les Assises Internationales ENVIROBIO.

La préparation de ce colloque résulte d'une synergie de volontés et de compétences souhaitant mobiliser techniques et savoir, et constitue le fruit d'une collaboration pluridisciplinaire forte.

**De par notre indépendance**, nous souhaitons développer à travers ce colloque :

- Un objectif **fédérateur** :
  - rapprochant les instances institutionnelles nationales et internationales,
  - regroupant largement les représentants des divers milieux professionnels de la santé, de l'environnement et de l'agriculture,
  - associant une réflexion entre l'enseignement, la recherche et tous ses domaines d'application.
- Un objectif **stratégique et méthodologique** :
  - par une approche globale et transdisciplinaire de la qualité et de la gestion des risques dans tous ses aspects :
    - Cliniques, toxicologiques
    - Epidémiologiques
    - Ecologiques
    - Réglementaires et juridiques
    - Techniques
    - Economiques
    - Qualité et Responsabilité
    - Institutionnels
    - Opinion publique
  - par le rassemblement et la confrontation des connaissances, y compris sur des thèmes controversés, pour permettre, dans la meilleure impartialité les débats et les synthèses, dans l'état actuel des connaissances scientifiques.

Dans ce contexte, une réflexion pluridisciplinaire approfondie, s'appuyant sur les publications des spécialistes internationaux et sur des débats contradictoires, sur le thème des nitrates, est apparue judicieuse : c'est l'objet central de ce colloque : permettre la confrontation des différents points de vue scientifiques et l'appréciation du thème dans toute sa pluridisciplinarité.

Ensuite, pour arrêter ses choix, le monde politique doit disposer des synthèses les plus justes et les mieux étayées et prévoir leur réactualisation pour une meilleure appréhension des choix concernant la sécurité sanitaire. C'est l'ambition de ce colloque avant tout scientifique de préparer à la synthèse indispensable pour la prise de décision par les structures qui en ont la charge, en toute connaissance de cause.

Ce colloque fait suite notamment au colloque *Managing risks of nitrates to humans and the environment* organisé en septembre 1997 par The Royal Society of Chemistry à l'Université d'Essex (U.K.).

Bien évidemment, tous les aspects ne pourront être traités ici de façon exhaustive, et d'autres journées comme celles-ci suivront et permettront de compléter notre réflexion.

Parce qu'il est essentiel pour notre société d'apprendre à discerner les risques réels des risques supposés, nous souhaitons que ces journées constituent un outil de travail et d'information servant de référence pour toutes les applications concernées.

Une dynamique existe ... continuons à la consolider

Construisons ensemble la Qualité et la pertinence des informations

Christian BUSON  
ISTE

Patrick TOUBON  
AACCES QUALIBIO

**ALLOCUTIONS D'OUVERTURE**

*Représentant du Sénat :*

**Monsieur Philippe NOGRIX** – Sénateur d'Ille-et-Vilaine  
*Conseiller Général*

- QUALIBIO -

**Positionnement des Assises**

***Professeur Maurice TUBIANA – Académie des Sciences***

La France est, depuis quinze ans, périodiquement balayée par des vagues de peurs sanitaires à propos de la dioxine, des pics de pollution atmosphérique, de la contamination radioactive de champignons ou de sangliers, des leucémies autour de la Hague, de la pollution d'origine agricole, des nitrates dans l'eau de boisson ou les rivières, et bien entendu de l'affaire de la vache folle.

Même quand la majorité des scientifiques considèrent ces risques comme faibles, voire inexistantes, ils font la une des journaux et accaparent l'attention, et souvent les crédits de recherches, tandis que les risques réels (le tabac, l'alcool, les drogues, les accidents, les suicides des jeunes, l'obésité, la sédentarité, etc..) qui sont responsables, chez les hommes, de plus de 60 % de décès prématurés (survenu avant 65 ans), ne sont guère discutés et que les crédits qui leur sont alloués sont réduits à la portion congrue. Les risques professionnels eux-mêmes sont insuffisamment étudiés.

Que peut-on faire contre ces inquiétudes disproportionnées ?

Il faudrait, d'abord, essayer avec le plus d'objectivité et de rigueur possibles d'évaluer quantitativement ces risques. Parler d'un risque doit être accompagné d'une estimation de sa grandeur. Ceux qui ont la responsabilité de fixer les normes se trouvent souvent dans des situations difficiles: les groupes de pressions, les consommateurs peuvent leur reprocher l'insuffisance de la marge de sécurité. Inversement les acteurs économiques peuvent récriminer contre le surcroît des coûts et des contraintes. Les autorités doivent donc s'appuyer sur des experts crédibles et indépendants. D'où l'importance croissante du rôle des experts scientifiques. Les Académies, notamment celles des sciences et de médecine, devront en accepter la charge, comme l'a dit le rapport sur le principe de précaution de Kourilsky-Viney, car elles ont l'avantage d'être indépendantes des pouvoirs politiques et des intérêts financiers et économiques; de plus elles sont multidisciplinaires et peuvent, en raison de leur prestige, faire appel à tous les experts nationaux et internationaux.

De plus, il ne suffit pas de fixer des normes, il faut insister sur la nécessité de leur révision périodique, en fonction de l'évolution des connaissances, tantôt pour les abaisser si les risques avaient été sous-estimés mais aussi les relever si les données scientifiques ne confirment pas les craintes initiales.

En effet, un niveau trop bas des normes, outre les inconvénients économiques, pose deux autres difficultés. D'une part si le public comprend mal la signification des normes, il s'imagine que quand la concentration s'approche de la valeur fixée par la

1 Membre de l'Académie des Sciences et de l'Académie de Médecine. Président du Centre Antoine Bécclère.

norme, cela entraîne déjà un danger et, a fortiori, quand elle le dépasse, il croit que ce danger devient grave. Or une norme est établie en supposant une ingestion quotidienne, tous les jours de l'année, de produits avec la concentration maximale fixée par la norme. Il en résulte que si la norme est dépassée pendant quelques jours, ou semaines, cela n'aura aucun inconvénient sanitaire si la concentration est, à d'autres périodes, est très inférieure à la norme. D'autre part, si le fondement scientifique des normes paraît peu crédible, cela entraîne un accroissement des infractions par exemple, quand la vitesse autorisée sur une route paraît trop basse, la limite est moins respectée.

Ainsi une norme requiert rigueur et objectivité dans l'estimation des risques, transparence dans le processus de décision (exposé des motifs et analyse précise des risques visés) et, crédibilité scientifique. Cela impose donc leur remise en question périodique car il n'est pas de vérité éternelle. Ces exigences sont indispensables à la mise en oeuvre dans de bonnes conditions d'une réglementation.

La transparence démocratique s'impose d'autant plus, au niveau d'un pays comme au niveau de l'Europe, que la fixation d'une norme peut être une façon détournée d'imposer une politique ou de limiter les échanges internationaux.

Une réunion telle que celle que nous avons aujourd'hui doit respecter les mêmes critères de rigueur scientifique et d'objectivité. Elle doit permettre à des experts dont les points de vue diffèrent, de s'exprimer et de discuter librement car dans le monde scientifique, il n'est ni tabou, ni dogme. Cependant, une controverse, n'est utile que si les arguments s'appuient sur des faits et non sur des opinions. Les faits ayant été clairement exposés, en reconnaissant et en délimitant les zones d'incertitude, il appartient ensuite aux hommes politiques de prendre leur responsabilité en connaissance de cause. La publication des comptes-rendus de ces controverses peut les y aider.

Over the past fifteen years, France has been swept by periodic health scares related to dioxin, peaks in air pollution, radioactive contamination of mushrooms or wild boar, leukemia around La Hague, pollution from agriculture, nitrates in drinking water or rivers, and mad cow disease.

Even when scientists consider these risks to be low, or nonexistent, they appear on the front page of newspapers. They monopolize research funds as well as the news, while real risks (tobacco, alcohol, drugs, accidents, suicide rates in the young, obesity, sedentary lifestyle, etc.), which are responsible for more than 60% of premature deaths (occurring before the age of 65), are barely discussed and funds allocated to them are constantly reduced. Furthermore, occupational risks are insufficiently studied.

What can be done to counter these disproportionate fears?

First, it is necessary to try, as objectively and rigorously as possible, to evaluate these risks quantitatively. Any talk of a risk should be associated with an estimation of its size. Those responsible for setting standards often find themselves in a difficult position: pressure groups and consumers may take them to task for not providing a sufficient safety margin. Conversely, those concerned by economic considerations may accuse them of increasing costs and constraints. The authorities must therefore rely on qualified and independent experts, hence the growing importance of the role of scientific experts. The Academies, notably the Academy of Sciences and the Academy of Medicine, should take on this task, as stated in the report by Kourilsky-Viney on the precautionary principle. These institutions have the advantage of being independent from political power and financial and economic interests. Moreover, they are multidisciplinary and, because of their prestige, can call upon national and international experts.

It is not sufficient to set standards alone, it is also necessary to revise them periodically, taking into account new developments. Limits should be lowered if risks have been underestimated, but they should be raised if scientific data do not confirm original fears.

Too low a limit presents two other difficulties as well as economic drawbacks. If the public does not completely understand the significance of a standard, it may believe that concentrations approaching the fixed standard value signify danger and when they go over the value, that the danger is serious. But a standard is established on the basis of a daily intake, all year round, of food containing the maximum concentration set by the standard. Therefore, if the concentration is higher than the standard over a few days, or weeks, there will be no negative health consequences if the concentration is much lower the rest of the time. Furthermore, if the scientific bases for the standards lack credibility, it leads to them being ignored. For example, when the speed limit on a road appears to be too low, it is less respected.

A standard requires rigor and objectivity in the estimation of the risks, transparency in the decision-making process (presentation of objectives and precise analysis of the risks concerned) and scientific credibility. This demands their periodic review because no truth is eternal. These requirements are indispensable to the good management of regulations.

Democratic transparency on the national and European level is especially important so as to avoid the misuse of regulations as a tool to impose policy or to limit free trade.

A symposium, such as ours today, must respect the same criteria for scientific rigor and objectivity. It should provide a forum for experts to express their differing viewpoints and to discuss freely, because in the scientific community there should be no taboos or dogmas. However, controversy is helpful only when arguments are based on facts and not opinions. Once the facts have been clearly presented, and the areas of uncertainty defined, it is the role of politicians to make the necessary decisions. Publication of these controversies in the proceedings will help them in their mission.

# Module 1

<p><b>EFFET DES NITRATES SUR LA SANTE PUBLIQUE ET EPIDEMIOLOGIE</b></p>
---

**Présidents de séance :**

**Professeur Christian CABROL :**

*Membre de l'Académie de Médecine – Assistance Publique des  
Hôpitaux de Paris*

**Docteur Patrick TOUBON :**

*Groupe physique Environnement – Université de Rennes*

- QUALIBIO -

**Professeur Claude PAREYN**

Professeur Honoraire à l'Université de CAEN

Rappel de l'origine du syndrome



La préoccupation envers les conséquences néfastes des taux excessifs de nitrates ne date pas d'hier ; la communication présentée a pour but de situer objectivement quelques jalons de la popularisation de la hantise qui sont replacés dans le temps.

Ce résumé se borne à évoquer des événements lointains tels que le travail de J.B. BOUSSINGAULT en 1856, sous Napoléon III, et le signal d'alarme du vétérinaire MAYO en 1895 confronté à la mortalité massive de cheptels de ruminants ayant ingéré des surplus de nitrates du CHILI dans leur fourrage, jusqu'à ce que le Docteur COMLY mette le doigt sur la cause de mortalité des nourrissons nés dans des fermes isolées.

Les préoccupations et publications de l'Académie d'Agriculture méritent une attention particulière, car elle se penche avec pertinence en 1967 et début 1968 sur « un respect méconnu du problème de l'eau ».

Il y a 144 ans, J.B BOUSSINGAULT s'inquiétait de la teneur excessive en nitrate de l'eau du puits que la boulangerie de l'Assistance Publique utilisait pour faire le pain à PARIS.

Rien de nouveau sous le soleil. Il en fut de même avec le phénomène de l'effet de serre explicité par le physicien français FOURIER dont les idées furent développées, avec juste mesure, par les physiciens POUILLET et TUNDALL (théorie de la serre chaude), jusqu'à ce que le suédois ARRHENIUS la développe (1896 et 1910) en rendant hommage à FOURIER qui œuvrait sans faire de vagues sous le règne de Louis XVIII.

**Professeur Alexander A. AVERY**

Hudson Institute – Center for Global Food issues – Churchville – Virginia  
- USA

**Synthèse des connaissances actuelles et  
recommandations sur l'évolution des normes aux  
USA**

L'ingestion des nitrates contenus dans les eaux de boisson a longtemps été considérée comme une cause majeure de la méthémoglobinémie des nourrissons. Cependant, des recherches récentes et un examen historique des cas offre un tableau beaucoup plus complexe des causes de cette méthémoglobinémie du nourrisson. Des infections gastro-intestinales et d'autres conditions inflammatoires, et la surproduction de monoxyde d'azote qu'elles provoquent, apparaissent être la cause essentielle de ces méthémoglobinémies. Cette conclusion entraîne que les valeurs limites en cours au sujet des nitrates dans les eaux de boisson qui sont basées uniquement sur les menaces sanitaires à propos de la méthémoglobinémie du nourrisson semblent inutilement sévères.

Ingestion of nitrates in drinking water has long been thought to be a primary cause of acquired infantile methemoglobinemia, often called infantile methemoglobinemia. However, recent research and a review of historical cases offer a more complex picture of the causes of infantile methemoglobinemia. Gastrointestinal infections and other inflammatory conditions and the consequent overproduction of nitric oxide appears to be the primary cause of infantile methemoglobinemia. This revelation suggests current regulations limiting nitrates in drinking water, which are based solely on the health threat of infantile methemoglobinemia, may be unnecessarily strict. **Key words:** infantile methemoglobinemia, diarrhea, drinking water, gastrointestinal disturbance, methemoglobinemia, nitrates, nitric oxide.

Ingestion of nitrates in drinking water has long been thought to be a primary cause of acquired infantile methemoglobinemia, often called infantile methemoglobinemia. However, recent research and a review of historical cases offer a more complex picture of the causes of infantile methemoglobinemia. Gastrointestinal infections and other inflammatory conditions and the consequent overproduction of nitric oxide appears to be the primary cause of infantile methemoglobinemia. This revelation suggests current regulations limiting nitrates in drinking water, which are based solely on the health threat of infantile methemoglobinemia, may be unnecessarily strict. **Key words:** infantile methemoglobinemia, diarrhea, drinking water, gastrointestinal disturbance, methemoglobinemia, nitrates, nitric oxide.

Address correspondence to A.A. Avery, Hudson Institute, Center for Global Food Issues, PO Box 202, Churchville, VA 24401 USA. Telephone: (540) 337-6354. Fax: (540) 337-8593. E-mail: [aavery@rica.net](mailto:aavery@rica.net)

Methemoglobin is a form of hemoglobin in which the heme iron is reduced to its ferric state and is unable to deliver oxygen. Methemoglobinemia results when amounts of methemoglobin in the blood become high enough to manifest clinical symptoms of cyanosis, usually about 15% of total circulating hemoglobin. Methemoglobinemia occurs for various reasons, including genetic deficiencies in key methemoglobin-reducing enzymes, genetic abnormalities in hemoglobin that make the protein more susceptible to oxidation, and exposure to oxidant drugs and chemicals, including nitrite. Infants under 6 months of age are particularly susceptible to methemoglobinemia because they have lower amounts of a key enzyme, NADH-cytochrome  $b_5$  reductase (methemoglobin reductase), which converts methemoglobin back to hemoglobin. Infants begin making adult levels of this enzyme by about 6 months of age (1). Although it has often been reported that high levels of fetal hemoglobin in the blood of young infants contributes to their increased susceptibility to methemoglobinemia, it has been demonstrated that fetal hemoglobin has the same redox potential and rate of auto-oxidation as hemoglobin A and therefore does not contribute to the increased vulnerability (1).

For over 40 years, there has existed a widespread belief that nitrates in drinking water are a primary cause of infantile methemoglobinemia. Hunter Comly originally proposed this theory in 1945 in a report in the *Journal of the American Medical Association* after treating several infantile methemoglobinemia victims exposed to nitrate-contaminated water (2). Comly proposed that because nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) are known to react directly with hemoglobin to form methemoglobin, nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) from drinking water must be converted to nitrites within the gastrointestinal tract of infants. Because many infants did not appear susceptible to methemoglobinemia from nitrate-contaminated water, Comly (2) suggested that the nitrate-to-nitrite conversion might only occur in the presence of a bacterial infection of the upper gastrointestinal tract, where such reactions could occur before nitrates are absorbed. These bacterial-derived nitrites could then react with hemoglobin to form methemoglobin and, in sufficient quantities, lead to the cyanosis of methemoglobinemia.

Comly's theory (2) became widely accepted as additional infantile methemoglobinemia cases with elevated nitrates in the water were reported. Limiting infant exposure to nitrates was therefore decided to be the most prudent approach to protecting infant health, and a committee from the American Public Health Association (APHA) conducted a nationwide survey to determine a safe level of nitrates in water. Data on a total of 214 cases were compiled. The results showed methemoglobinemia incidence correlated with increasing nitrate levels (Table 1) (3). Because no infantile methemoglobinemia cases were observed with concentrations  $< 10$  ppm nitrate-nitrogen (nitrate-N), the United States and the World Health Organization established a maximum contaminant level (MCL) of 10 ppm nitrate-N for nitrate in drinking water.

**Table 1.** Reported Cases of Nitrate Water-Induced Infant Methemoglobinemia Classified According to Nitrate-Nitrogen Concentration of Water Used in Feeding Formula

State	Methemoglobinemia		Number of cases associated with indicated ranges of nitrate-N concentration (ppm)						Cases with available data
	Reported cases	Reported deaths	0-10	11-20	21-30	31-50	51-100	100+	
California	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Georgia	6	3	—	—	—	—	—	—	0
Illinois	75	6	0	1	2	2	12	11	28
Indiana	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Iowa	Several	11	0	0	0	0	1	1	2
Kansas	13	3	0	0	1	1	2	8	12
Michigan	7	0	0	0	0	0	0	7	7
Minnesota	139	14	0	2	25		53	49	129
Missouri	2	0	0	0	0	0	0	2	2
Nebraska	22	1	0	1	0	4	9	8	22
New York	2	0	0	0	0	0	1	0	1
North Dakota	9	1	0	1	1	0	0	6	8
Ohio	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oklahoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0
South Dakota	Several	0	—	—	—	—	—	—	—
Texas	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Virginia	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	278+	39	0	5	36		81	92	214
Percent of Total			0.0	2.3	16.8		37.8	43.1	100

\*Based on Table 1 from Walton (3).

Over the last 20 years, however, a more complex picture of infantile methemoglobinemia causation has emerged which indicates that current limits on drinking water nitrates may be unnecessarily strict. It is now well established that diarrheal illness and some gastrointestinal disturbances, typically accompanied by diarrhea and/or vomiting, can lead to methemoglobinemia in young infants without exposure to high-nitrate drinking water or exposure to abnormal levels of nitrates through food. There are literally dozens of reported infantile methemoglobinemia cases associated with diarrhea without exposure to nitrate-contaminated water (4-10). Because diarrhea was a prominent symptom in the majority of drinking water-linked methemoglobinemia cases, the evidence suggests that diarrhea and/or gastrointestinal infection/inflammation, not ingested nitrates, are the principle causative factor in infantile methemoglobinemia; a survey in Germany found that 53% of 306 infantile methemoglobinemia cases reported diarrhea (11). (Contrary to some reports, diarrhea and vomiting are not symptoms that typically accompany cyanosis, methemoglobinemia due to oxidant drug exposure, or genetic abnormalities in hemoglobin.)

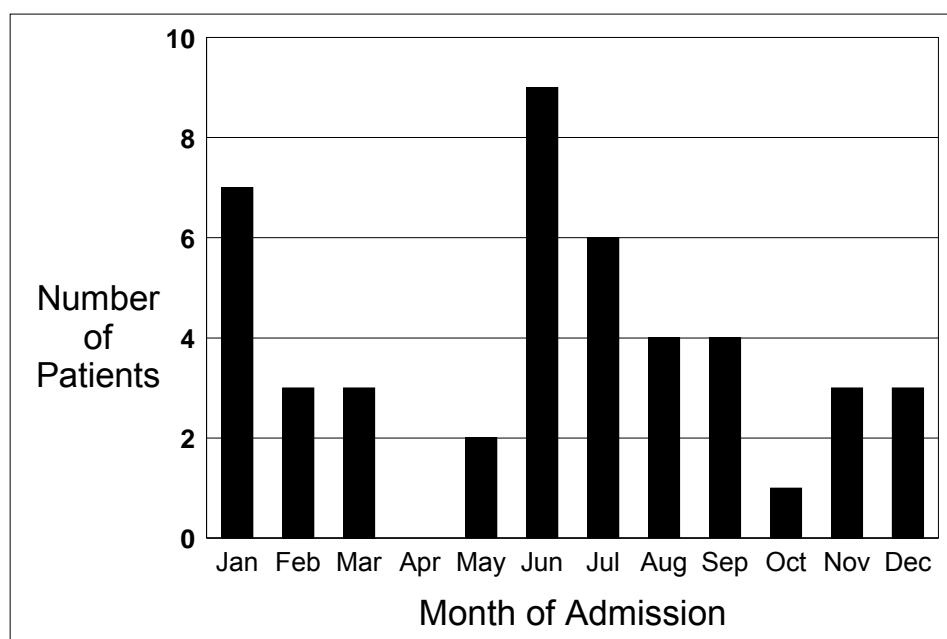
A putative mechanism whereby gastrointestinal inflammation leads to methemoglobinemia has been established. Nitric oxide (NO) is produced by several tissues in response to infection and inflammation. Increased expression of an inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA has been observed in young children with inflammatory bowel disease during periods of colonic inflammation, but not, however, in the absence of colonic inflammation (12,13). A rapid up regulation of iNOS mRNA is also seen in colon epithelial cells upon infection with enteroinvasive bacteria (14). Nitrite is a product of nitric oxide metabolism, and increased expression of iNOS mRNA from colonic inflammation is accompanied by increased stool and plasma nitrate/nitrite levels (13). In young infants, overexpression of nitric oxide can lead to nitrite production sufficient to overwhelm the underdeveloped methemoglobin-reducing system, resulting in methemoglobinemia. Indeed, methemoglobinemia is a well-known side effect of nitric oxide therapy for acute respiratory distress syndrome and persistent pulmonary hypertension in newborns, and such therapy requires close monitoring of methemoglobin levels (15).

This is supported by observations that infants suffering from diarrhea and methemoglobinemia (without exposure to nitrate-contaminated water) excrete up to 10 times more nitrate daily than they ingest through food or water (16). As nitrites are metabolized to nitrates before excretion, excess nitrate excretion is an indicator of endogenous nitrite production. Infants with methemoglobinemia associated with gastroenteritis and/or dehydration also have significantly longer average hospital stays than infants with methemoglobinemia secondary to oxidant drug exposure, indicating chronic, endogenous oxidant stress--presumably endogenous nitrite production from nitric oxide (17). Despite similar initial methemoglobin levels in the endogenous (mean, 29%) and exogenous (mean, 28%) groups, children in the endogenous group stayed an average of 19 days in the hospital, whereas in the exogenous group, methemoglobinemia resolved within 1 day. As Avner et al. (17) stated,

The shorter, more benign course of illness [of children with methemoglobinemia due to acute poisoning] may reflect a relatively brief exposure to the oxidant stress ... compared with ongoing exposure over a prolonged period in children with methemoglobinemia associated with gastroenteritis and dehydration.

Protein intolerance accompanied by diarrhea and/or vomiting has also been proven to cause methemoglobinemia in infants less than 6 months of age without excessive intake of nitrates through food and water (18,19). Methemoglobin levels over 35% have been recorded in protein-intolerant infants following brief exposure to the offending protein (18). Moreover, although over 90% of exogenous nitrate exposure comes from food, the only methemoglobinemia cases linked to food have involved high levels of nitrite contamination. For example, a typical case involved carrot juice containing 775 ppm nitrite-N, which is over 700 times the MCL for nitrites (20). All of these observations strengthen the view that endogenous nitrite production, not exogenous nitrate contamination of drinking water, is the primary cause of methemoglobinemia.

**Figure 1.** The seasonal variation in the incidence of methemoglobinemia in a region of Israel



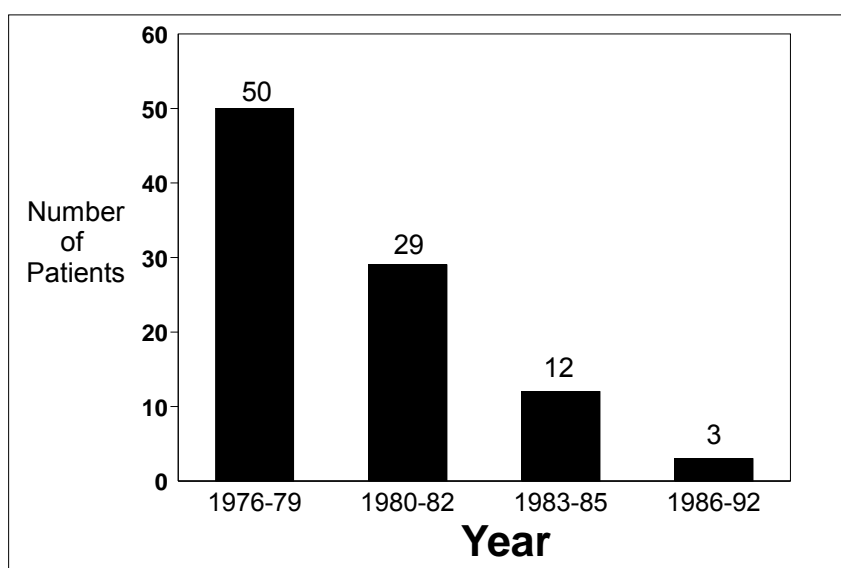
during a 12-year period (1980-1992). Data from Hanukoglu and Danon (19).

Epidemiological evidence suggests that many infantile methemoglobinemia cases may also have an infectious etiology. A 54-year-old woman who suffered chronic methemoglobinemia for 15 years saw a disappearance of the condition after a 10-day course of neomycin (21). Infantile methemoglobinemia resulting from urinary tract infection has been reported in over a dozen instances (22,23). Infectious bacterial and viral gastroenteritis may underlie many infantile methemoglobinemia cases. Several methemoglobinemia cases have been reported as resulting specifically from bacterial enteritis or suspected bacterial sepsis without exposure to high nitrate water (24-26). Further, an Israeli study of 45 infant methemoglobinemia cases over a 12-year period (all from urban areas with normal concentrations of nitrate in the drinking water) revealed a seasonal variation in methemoglobinemia incidence (19). The incidence of methemoglobinemia showed two peaks, in January ( $n = 7$ , 16%) and in the summer months ( $n = 23$ , 51%; Figure 1). As Hanukoglu and Danon (19) noted,

these [incidence] peaks correspond to times when infectious gastroenteritis is common (viral agents, especially rotavirus, in winter and bacterial agents in summer).

Hanukoglu and Danon (19) further noted that the declining incidence of methemoglobinemia observed over a decade also supported an infectious etiology (Figure 2).

The incidence of methemoglobinemia was highest before 1980 and decreased significantly to a minimum during the last 6 years of our survey. This was paralleled by a significant decrease in infant morbidity and hospitalization rates of patients with infantile diarrhea due to bacterial pathogens in our hospital during the same period, despite the increase in the pediatric population in the area served by our hospital. Presumably the morbidity of non-bacterial gastroenteritis is also decreasing. A similar trend was also observed over the whole country.



**Figure 2.** The number of patients hospitalized for methemoglobinemia in a region of Israel from 1980 to 1992. Data from Hanukoglu and Danon (19).

A similar drop in methemoglobinemia incidence appears to have occurred in the United States during the 1950s and 1960s.

#### Implications for Regulation

There are a number of considerations to examine regarding a regulatory drinking water nitrate limit. We know that exposure to even high levels of exogenous nitrates in drinking water is insufficient by itself to cause methemoglobinemia, even among young infants. This was demonstrated conclusively by experiments conducted with human infants in the 1940s. Four healthy infants ranging from 2 days to 6 months of age were fed formula prepared with water containing ~100 ppm nitrate-N. Despite ingesting such highly contaminated formula for more than a week, the highest methemoglobin level observed was 7.5% with no cyanosis evident in any of the patients. Even when fed to several infants hospitalized for methemoglobinemia ostensibly linked to nitrate contaminated water, the highest methemoglobin level recorded was 11 percent (27). As the researchers noted, "it appeared that there were other factors in addition to the quantity of nitrate ion ingested that determined whether or not an infant became cyanotic." All available evidence points to diarrhea, gastrointestinal inflammation (i.e. from protein intolerance), or infection as the critical factors.

If nitrates do not cause methemoglobinemia, how much do exogenous nitrates exacerbate methemoglobinemia caused by other factors? This is the critical question for establishing a sound regulatory health standard for nitrate in drinking water.

The U.S. drinking water standard of 10 ppm nitrate-N was established following review of data from just 214 cases. As reported by Walton in 1951 (3), "Special emphasis was placed on restricting the data to those cases definitely associated with nitrate-contaminated water." This created an inherent bias in both the APHA survey and in the medical community, where it was assumed that nitrates

caused any infantile methemoglobinemia case with above normal nitrates in the water. By excluding low-nitrate infantile methemoglobinemia cases, the APHA survey was virtually guaranteed to find that any nitrate concentration above background was unsafe. If all infantile methemoglobinemia cases had been included in the APHA survey, not just those with above normal nitrate levels, it would have been discovered much sooner that severe infantile methemoglobinemia can occur at all levels of nitrate exposure—from zero ppm nitrate-nitrogen upward—and that diarrhea and gastrointestinal problems are the real cause. The medical literature includes reports of cyanosis associated with diarrhea as far back as 1904.

The current 10 ppm standard is also based on very limited and poor quality case information. The APHA survey did not report the presence of nitrite, bacteriologic contamination, gastrointestinal disease, diarrhea, or methemoglobin concentration. Walton wrote, "It should be noted, that in many of these cases clinical data were insufficient for definite diagnosis, and samples of water for the analysis were sometimes collected several months following the occurrence of the case." (3) This is hardly a sound scientific basis for any regulation, let alone one with as much cost to society as the nitrate standard.

Some groups, especially environmental groups, have used the existence of methemoglobinemia cases at drinking water nitrate concentrations below 10 ppm nitrate-N to argue that the current federal standard should be reduced to 5 ppm. At what point does one stop with this logic? Does the existence of methemoglobinemia cases at water concentrations of 1 ppm nitrate-N require a standard below this level?

### **Conclusion**

There is little question that high levels of nitrates in drinking water can contribute to the severity of methemoglobinemia caused by other factors. What constitutes "high nitrate levels" is open to debate however, and this is an area where the unquestioning attitude of the public health community has stifled research that would have yielded valuable case information and epidemiological data.

I have argued, based on extensive review of infantile methemoglobinemia research and a century's worth of case reports, that the drinking water nitrate standard could be raised to 15 or 20 ppm without increasing the risks to infants. This is based primarily on the bias and poor quality data in the single study on which the current regulatory standard is based, as discussed above. A more complete data set would likely indicate that methemoglobinemia cases occurring with water at 15-20 ppm nitrate nitrogen were primarily the result of bacterial contamination or other severe gastrointestinal causes, and endogenous oxidative stress, not the relatively low nitrate contribution from water used to prepare or dilute the infant formula. The vast majority of case reports are with nitrate levels above 30-40 ppm nitrate nitrogen. However, the problem with any proposed standard is the fact that infantile methemoglobinemia can occur with zero nitrate exposure, which creates a conundrum: *how does one measure the contribution of relatively low levels of nitrates to the severity of a infantile methemoglobinemia case in order to establish a scientifically-sound nitrate standard?* Such a standard is predicated on the false notion that nitrates are the primary cause of infantile methemoglobinemia.

Much more research on infantile methemoglobinemia is needed before these questions could be answered with enough clarity to properly advise public health policy. The answer may also be that no definite conclusions can ever be drawn and zero exogenous nitrate exposure is the only absolutely safe exposure for young infants. If that were the case, feeding infants reconstituted or diluted concentrated formula would be prohibited.

It is clear, however, that limiting nitrates in drinking water is not effective at preventing infantile methemoglobinemia. The case literature now abounds with cases in which there are no nitrates in the water. While nitrates may contribute to the severity of infantile methemoglobinemia, especially at high levels above 40 ppm nitrate nitrogen, the evidence indicates they do not cause it. If the goal is protecting infant health, then the best approach would be to prevent and treat the conditions that actually cause infantile methemoglobinemia, such as bacterial and viral gastroenteritis.

Instead of focusing on nitrate levels in drinking water, which has distracted doctors and public health officials from the real problems, we should educate everyone that any infant less than six months of age with diarrhea or other gastrointestinal illness—especially low birth weight and premature babies—is at risk of infantile methemoglobinemia. The nitrate scare has fooled us for too long.



### References and Notes

1. Lukens JN. The legacy of well-water methemoglobinemia. *JAMA* 257:2793-2795 (1987).
2. Comly HH. Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *J Am Med Assoc* 129:112-116 (1945).
3. Walton G. Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrate-contaminated water. *Am J Public Health* 41:986-996 (1951).
4. Yano SS, Danish EH, Hsia YE. Transient methemoglobinemia with acidosis in infants. *J Pediatr* 100:415-418 (1982).
5. Bricker T, Jefferson LS, Mintz AA. Methemoglobinemia in infants with enteritis [letter]. *J Pediatr* 102:161-162 (1983).
6. Danish EH. Methemoglobinemia in infants with enteritis [letter]. *J Pediatr* 102:162-163 (1983).
7. May RB. An infant with sepsis and methemoglobinemia. *J Emerg Med* 3:261-264 (1985).
8. Kay MA, O'Brien WO, Kessler B, McVie R, McCabe ERB. Transient organic aciduria and methemoglobinemia with acute gastroenteritis. *Pediatrics* 85:589-592 (1990).
9. Leppy T, Roco JJ, Arcinue EL. Infantile methemoglobinemia associated with acute diarrheal illness. *Am J Emerg Med* 11:471-472 (1993).
10. Gebara B, Goetting MM. Life-threatening methemoglobinemia in infants with diarrhea and acidosis. *Clin Pediatr* 33:370-373 (1994).
11. Simon C, Manzke H, Kay H, Mrowetz G. Über Vorkommen, Pathogenese und Möglichkeiten zur Prophylaxe der durch Nitrit verursachten Methämoglobinämie. *Z Kinderheilk* 91:124-138 (1964).
12. Gupta SK, Fitzgerald JF, Chong SK, Croffie JM, Garcia JG. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in inflamed esophageal and colonic mucosa in a pediatric population. *Am J Gastroenterol* 93:795-798 (1998).
13. Levine JJ, Pettei MJ, Valderrama E, Gold DM, Kessler BH, Trachtman H. Nitric oxide and inflammatory bowel disease: evidence for local intestinal production in children with active colonic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26(1):34-38 (1998).
14. Witthoft T, Eckmann L, Kim JM, Kagnoff MF. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol* 275:574-571 (1998).
15. Dötsch J, Suha D, Hamm R, Knothe C, Bauer J, Kühl PG, Rascher W. Extracorporeal circulation increases nitric oxide-induced methemoglobinemia *in vivo* and *in vitro*. *Crit Care Med* 25(7):1153-1158 (1997).
16. Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 125:107-115 (1982).
17. Avner JR, Henretig FM, McAnaney CM. Acquired methemoglobinemia: the relationship of cause to course of illness. *Am J Dis Child* 144:1229-1230 (1990).
18. Murray KF, Christie DL. Dietary protein intolerance in infants with transient methemoglobinemia and diarrhea. *J Pediatr* 122:90-92 (1993).
19. Hanukoglu A, Danon PN. Endogenous methemoglobinemia associated with diarrheal disease in infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 23:1-7 (1996).
20. Keating JP, Lell ME, Strauss AW, Zarkowsky H, Smith GE. Infantile methemoglobinemia caused by carrot juice. *N Engl J Med* 288:824-826 (1973).
21. Rossi EC, Bryan GT, Shilling RF. Remission of chronic methemoglobinemia following neomycin therapy. *Am J Med* 40:440 (1966).
22. Hanukoglu A, Fried D, Bodner D. Methemoglobinemia in infants with enteritis [letter]. *J Pediatr* 102:161-162 (1983).
23. Luk G, Riggs D, Luque M. Severe methemoglobinemia in a 3-week old infant with urinary tract infection. *Crit Care Med* 19:1325-1327 (1991).
24. Smith MA, Shah NR, Lobel JS, Hamilton W. Methemoglobinemia and hemolytic anemia associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 10:35-38 (1988).
25. Dagan R, Zaltzstein E, Gorodischer R. Methemoglobinemia in young infants with diarrhea. *Eur J Pediatr* 147:87-89 (1988).
26. Jolly BT, Monico EP, McDevitt B. Methemoglobinemia in an infant: case report and review of the literature. *Pediatr Emerg Care* 11:294-297 (1995).
27. U.S. EPA. Another Look: National Pesticide Survey. Phase II Report. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency, 1992.
28. Johnson CJ, Bonrud PA, Dosch TL, Kilness AW, Senger KA, Busch DC, Meyer MR. Fatal outcome of methemoglobinemia in an infant. *JAMA* 257:2796-2797 (1987).
29. Knoblock L, Krenz K, Anderson H. Methemoglobinemia in an infant--Wisconsin, 1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42:217 (1993).

- QUALIBIO -

30. 30. Roediger WEW, Radcliffe BC. Role of nitrite and nitrate as a redox couple in the rat colon, implications for diarrheal conditions. *Gastroenterology* 94:915-922 (1988).
  31. Cornblath M, Hartmann AF. Methemoglobinemia in young infants. *J Pediatr* 33:421-425 (1948).
  32. Faivre J, Faivre M, Klepping C, Roche L. Methemoglobinemias caused by ingestion of nitrites and nitrates. *Ann Nutr Aliment* 30:831-838 (1976).
  33. Hack WW, Dowes AC, Verman AJ. A source of nitrite poisoning in young children. *Ned Tijdschr Geneesk* 6:127:1428-1431 (1983).
  34. Sander C, Jacobi H. Methemoglobinemia poisoning in a two year old boy after eating spinach. *Z Kinderheilkd* 98:222-226 (1967).
  35. Ritter R, Schulze U. Methemoglobinemia following nitrite poisoning by a dinner kohlrabi. *Dtsch Krankenpflegez* 24:223-225 (1971).
  36. National Research Council Subcommittee on Nitrate and Nitrite in Drinking Water. *Nitrate and Nitrite in Drinking Water*. Washington, DC:National Academy Press, 1995.
  37. Demissie M, Keefer L. Illinois State Water Survey: Watershed Monitoring for the Lake Decatur Watershed. Champaign, IL:ISWS Miscellaneous Publication 169 (1996).
-

**Professeur André RICO**

Président de la Commission des Toxiques en agriculture  
(Ministère de l'Agriculture)  
Membre correspondant de l'Académie de Médecine

**Physiologie des nitrates chez les mammifères**

Les nitrates sont des composés minéraux de l'azote que l'on trouve naturellement dans les sols, les eaux, les plantes, les animaux, les insectes.

L'objectif de ce document est de brosser un rapide panorama de la physiologie des nitrates chez les mammifères. Cependant, pour mieux comprendre cette physiologie, un bref rappel des caractéristiques physiques et chimiques des nitrates nous paraît nécessaire.

### **RAPPELS DE PHYSIQUE ET CHIMIE**

La structure des nitrates est  $\text{NO}_3^-$ . Ce sont des dérivés oxygénés de l'azote obtenus à partir de l'acide nitrique par salification.

Au plan physique, tous les sels métalliques de l'acide nitrique et en particulier les nitrates de sodium et de potassium sont très hydrosolubles. Cette hydrosolubilité explique qu'ils ne sont pas cumulatifs chez les mammifères et excrétés aisément.

Au plan chimique, tous les degrés d'oxydation de l'azote sont possibles entre  $-3$  et  $+5$ . Les nitrates constituent la forme la plus oxydée de l'azote. Les nitrates sont chimiquement stables.

On peut obtenir les nitrates à partir de l'oxydation de l'ammoniac et aussi des dérivés  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ .

Inversement, les nitrates peuvent être transformés par réduction en ammoniac et intermédiaires moins oxygénés, comme les nitrites.

Ces différentes réactions, plus spécialement la réduction en nitrite et ammoniac, sont possibles dans le monde vivant par action de systèmes enzymatiques spécifiques.

### **ORIGINE (1) (2)**

Chez les mammifères et l'homme, l'origine des nitrates est double : origine exogène et origine endogène.

Origine exogène : Les nitrates sont apportés surtout par l'alimentation et secondairement par l'eau de boisson. L'essentiel des apports est dû aux végétaux qui sont à l'origine chez l'homme de 80% des nitrates ingérés, tandis que l'eau de boisson ne représente habituellement qu'une faible proportion, en général moins de 10 à 15%.

Origine endogène : Il existe une origine endogène non négligeable des nitrates en particulier à partir du monoxyde d'azote qui joue comme médiateur chimique de nombreux rôles chez les mammifères et l'homme.

### **ABSORPTION (1) (2) (3) (4)**

Une fois ingérés chez les monogastriques, les nitrates traversent l'œsophage et arrivent dans l'estomac. Ils sont rapidement et presque totalement absorbés dans la partie haute de l'intestin grêle. Ils gagnent ainsi le sang où ils se trouvent mêlés aux nitrates d'origine endogène. Les taux plasmatiques de nitrates ne sont jamais nuls. Les nitrates sont toujours présents dans le sang. La nitratémie moyenne se situe entre 3 et 5 mg/l, mais peut aller jusqu'à 10 et 25 mg/l après ingestion conséquente.

Chez les ruminants, mais pas chez le veau qui est de fait un monogastrique, les nitrates exogènes sous l'action des microorganismes du rumen sont réduits en nitrites, qui peuvent se révéler toxiques et aussi en ammoniac.

### **DISTRIBUTION ET EXCRÉTION (1) (2)**

Les nitrates sont distribués aux différents organes par le sang et ensuite excrétés par l'urine et aussi le colon et les fèces. La voie urinaire est prépondérante chez les mono gastriques lorsque la teneur en nitrates est moyennement élevée. Chez les polygastriques, elle est beaucoup plus faible. En cas d'ingestion importante de nitrates, la voie intestinale peut se révéler une voie non négligeable. Il existe certainement une excrétion active des nitrates au niveau du gros intestin chez l'homme et chez le cheval. Chez cette dernière espèce la réduction des nitrates dans le cæcum est très importante à l'image de ce qui se passe chez les ruminants.

Une sécrétion salivaire non négligeable existe chez les animaux et chez l'homme à l'exception du rat. Cette sécrétion salivaire, mais aussi accessoirement sudorale se fait par transport actif. On peut estimer que 25% des nitrates sanguins chez l'homme se retrouvent dans la salive. Cette sécrétion varie en fonction de l'ingestion et est maximale 3 à 6 heures après celle-ci.

Au total, l'excrétion reste avant tout rénale et secondairement intestinale avec une sécrétion salivaire non négligeable.

### **BIOTRANSFORMATION DES NITRATES (1) (4) (5)**

Nous avons vu dans le premier chapitre que les nitrates peuvent être réduits en nitrites voire en ammoniac. Cette réaction se fait par voie enzymatique dans de nombreux microorganismes mais existe certainement aussi en très faible quantité au niveau de certains tissus. Ceci est vrai chez l'homme et chez les autres animaux. Chez l'homme, cette réaction est importante au niveau buccal (nitrites salivaires). On estime celle-ci à environ 5% des nitrates sécrétés. La réduction en nitrites est quasi inexistante dans l'estomac sauf en cas de pH anormalement élevé (hypochlorhydrie). Par contre, elle est importante dans le colon riche en bactéries. Il s'agit là de la principale source de nitrites endogènes chez l'homme et les monogastriques.

### **RÔLE DES NITRATES (1)**

Les nitrates, bien qu'étant des électrolytes, n'interviennent pas dans la régulation de la pression osmotique sanguine et cellulaire. On pourrait leur reconnaître un rôle dans le cadre de la sécrétion salivaire : ils présenteraient des activités antibactériennes voire biochimiques sur le préparation des aliments à la digestion

En ce qui concerne l'excrétion colique, elle est aussi nécessaire à l'équilibre et à l'activité normale de la flore intestinale.

### **TOXICITÉ DES NITRATES (5) (6)**

Bien que ne faisant pas partie de la physiologie, la toxicité ne doit pas être oubliée. Disons simplement que par eux-mêmes les nitrates ne sont pas toxiques. Leur toxicité est essentiellement rattachée à leur biotransformation en nitrites, qui peut être à l'origine chez les jeunes enfants et les ruminants d'accidents de méthémoglobinisation.

En conclusion et résumé, la physiologie des nitrates chez les mammifères est simple. Les nitrates sont apportés par l'alimentation, surtout par l'ingestion de végétaux, mais aussi synthétisés dans l'organisme. Compte tenu de leur solubilité, ils sont éliminés aisément par voie urinaire et secondairement intestinale et ils ne s'accumulent pas. Ils sont sécrétés dans la salive et aussi par le colon. Leur transformation bactérienne en nitrites peut être source de méthémoglobinisation rapportée, dans certaines conditions, chez les jeunes enfants et les autres espèces animales comme les ruminants.

### **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 Technical report N°27 : Nitrates and drinking water. ECETOC. Brussels (1988) 1-164.
- 2 L'Hirondel J. et l'Hirondel J.L. : Les nitrates et l'homme, le mythe de leur toxicité. Monographie (1996).
- 3 Schneider N.R. and Yeary R.A. : Nitrites and nitrates, pharmacokinetics in the dog, sheep and pony. Am. Jal. Vet. Res. 36 (1975) 941-947.
- 4 Bruning-Fann C.S. and Kaneene J.B. : The effects of Nitrates, Nitrites and N-Nitroso compounds on animal health. Vet. Human Toxicol. – 35 (3) (1993) 237-253.
- 5 Vittozzi L. : Toxicology of nitrates and nitrites. Food Add. and Contam. 9, n° 5 (1992) 579-585.
- 6 Bruning-Fann C.S. and Kaneene J.B. : The effects of Nitrates, Nitrites and N-Nitroso compounds on human health.. A review. Vet. Human toxicol. – 35 (6) (1993) – 521.531.

**Professeur Etienne FOURNIER**

Académie des Médecine  
Professeur Honoraire de Clinique Toxicologique  
Hôpital Ferdinand Vidal – PARIS

**Existe-t-il une science toxicologique ?**

La toxicologie est une discipline qui observe les effets pour l'homme des produits chimiques, simples ou composés, naturels ou résultant de l'activité humaine. Elle suppose des connaissances médicales et des connaissances chimiques.

Les intoxications aiguës sont parfaitement connues depuis plus d'un siècle et la description des effets nocifs survenant en quelques jours ou quelques semaines s'accumulent dans tous les livres de toxicologie.

Pour les affections d'apparition lente, lors de l'utilisation d'eaux chargées en minéraux comme les fluorures ou certains dérivés de l'arsenic, les intoxications chroniques (fluoroses, arsenicisimes) sont bien connues.

Depuis des décennies, une réglementation mondiale définit ce que la collectivité scientifique appelle l'eau potable. Les ions nitrates y figurent au taux maximum de 50 mg/l. Il ne s'agit pas de concentrations dangereuses ou nuisibles à la santé d'une collectivité, mais d'un taux dit de précaution. Est-il utile de réclamer une eau potable contenant moins de minéraux dissous ? La réponse médicale est évidemment non.

L'augmentation du facteur de sécurité peut être une satisfaction intellectuelle ou idéologique, mais aucun toxicologue ne s'attache à la surabondance des précautions inutiles.

Le cas des nitrates est exemplaire, parce que le taux nocif dans l'eau de boisson n'est pas réellement « connaissable » puisque ces ions sont présents dans les aliments végétaux et que l'analyste ne peut différencier dans un estomac humain la part revenant à l'eau et celle revenant aux aliments : donc la question n'a aucun sens.

En résumé, première notion toxicologique fondamentale : tout ion nitrate absorbé qu'il provienne de l'eau, des aliments (ou de l'air respiré) est identique à son voisin. C'est une loi de chimie des molécules, connue depuis plus de deux siècles.

Rappel de toxicologie « quasi-expérimentale » aiguë des nitrates .

Depuis des siècles, les nitrates sous forme de sel de potassium (sel de terre, salpêtre) ont été prescrits à la dose de plusieurs grammes par des médecins. Ils étaient considérés essentiellement comme diurétiques en cas d'œdèmes cardiaques, diurèse vraisemblablement obtenue par la concentration osmotique de l'urine riche en nitrate ; c'est encore le composant essentiel de nombreuses tisanes.

Les nitrates ne sont pas irritants, allergisants, mutagènes, ou tératogènes aux doses absorbées par la population. Donc pas de menace de maladies tardives, pas de crainte pour la Santé Individuelle.

Les seules anomalies authentiquement écrites par les médecins pédiatres et les toxicologues (humains et vétérinaires) sont des cas de cyanose avec méthémoglobinémie rares, observés chez les nourrissons absorbant des biberons trop riches en nitrates.

### **Deuxième constat évident, mais essentiel**

Les nitrates ajoutés à l'hémoglobine ne forment pas de méthémoglobine.

Or, une règle de la toxicologie impose pour toute intoxication une explication chimique, un mécanisme comprenant une formule de réaction, un équilibre par loi d'action de masse, des inhibiteurs et des catalyseurs. Les nitrites se présentent comme de bons candidats à l'intoxication. Ils sont rapidement absorbés, forment des dérivés nitrosés biologiques. De vieilles pratiques de charcuterie utilisent des nitrites pour donner aux viandes conservées une belle couleur rouge de nitroso-myoglobine. A dose suffisante, les ions nitrite débordent l'action d'une méthémoglobine réductase physiologique présente dans l'hématie.

Le toxicologue qui n'observe pas de cyanose tant avec les nitrates qu'avec une petite quantité de nitrites dira au minimum et très naturellement toxicité des nitrates = Impossible.

Confronté aux observations des pédiatres, très peu nombreuses mais indiscutables, il s'interroge et cherche un mécanisme réducteur puissant, éventuellement une disposition génétique, congénitale ou pathologique expliquant la sensibilité du nourrisson.

Les théories explicatives modernes de la nocivité des produits nitrates chez le nourrisson passent en effet par une étape réductrice bactérienne avec formation de nitrites, directement méthémoglobinisants chez certains nourrissons dont la fonction méthémoglobine-réductase physiologique est peu active. La formation de nitrites serait la conséquence des pullulations de

bactéries réductrices existant soit dans le biberon, soit dans le colon de l'enfant, important réservoir bactérien (normal ou pathologique – les diarrhées sont fréquentes).  
L'hypothèse biberon est de loin la plus solide car son contenu est un milieu de cultures idéal.

Interdire de donner aux nourrissons une eau contenant plus de 50 mg/l de nitrates n'est qu'une précaution accessoire. L'important étant que l'eau ne contienne pas de germes pathogènes, banal problème d'hygiène...

Le taux en nitrates étant nettement plus élevé dans la plupart des bouillons de légumes, soupes et purées végétales, leur conservation doit aussi être surveillée et les mères instruites du danger potentiel. Depuis les découvertes Pastoriennes, l'hygiène de l'eau passe par sa non contamination par des déchets et des rejets organiques en raison de la transmission toujours possible de germes du genre Colibacilles, Salmonelles et autres facteurs de diarrhées, infections et toxico-infections graves. La présence de nitrates dans les végétaux comestibles étant constante, le toxicologue clinicien qui ne constate aucune perturbation de la santé des végétariens et des végétaliens est parfaitement tranquille, aussi bien pour l'individu que pour les générations successives, dès lors que les carences sont évitées.

Une troisième loi de la toxicologie moderne rappelle que les nuisances ne sont pas synonymes d'intoxications immédiates ou tardives. La première nuisance chimique est l'odeur.

Des liquides biologiques aussi abondants que la salive contiennent des nitrites physiologiques. Le suc et contenu gastrique au contraire n'en contiennent pratiquement pas malgré l'absorption de salive, ce qui suppose un passage extrêmement rapide des nitrites vers le sang, puis une destruction rapide dans l'estomac.

C'est un point essentiel de toute discussion toxicologique. Les produits « anthropiques », synthétisés par l'homme aux concentrations physiologiques, sont difficilement retenus comme cause normale de cancers, de maladies dégénératives, d'apoptoses et de vieillissement prématurés.

#### **Quid des nitrosamines ?**

Expérimentalement l'ingestion prolongée à doses élevées, prolongées et compatibles avec la survie, d'un mélange de nitrite de sodium et de certaines amines provoque indiscutablement des cancers gastriques chez le rat, mais l'estomac de l'homme normal ne contient pratiquement pas de nitrites. Les nitrosamines (alimentaires ?) devraient avoir une action limitée à la cavité buccale. Encore faudrait-il les trouver là. A ce niveau, on parle plutôt de l'effet du tabagisme et de l'alcool. Sauf à parler de cancérogenèse endogène, il est difficile de faire jouer un rôle mutagène et/ou cancérogène à une série radicalaire fabriquée dans l'organisme humain (anthropique) et qui conduit aux nitrites et nitrates.

Vient la très importante découverte des oxydes d'azote biomédiateurs vasculaires et produit de défense cellulaire, nouveauté d'importance considérable, NO et NO<sub>2</sub> étant effectivement synthétisés dans l'organisme humain à partir d'acides aminés proches du cycle de l'urée.

Le cycle des oxydes d'azote va répondre très simplement aux observations d'allure paradoxale comme la synthèse « in situ » de NO, puis de nitrites, comme l'effet thérapeutique d'esters nitrés organiques comme le trinitrate de glycérol, trinitrine ou nitroglycérine.

NO a été reconnu comme un régulateur physiologique de la circulation sanguine (ce qui n'est pas indiqué dans la plupart des rapports officiels, alors que le phénomène était connu de tout biologiste).

Le radical NO est normalement formé dans l'organisme par un groupe d'enzymes : les Monoxydes d'azote-Synthases, enzymes oxydants puissants puisqu'ils réalisent précisément la formation de NO à partir d'acides aminés.

En conclusion, le thème nitrates est paradoxalement utilisé comme symbole de toxicité, alors qu'il s'agit de produits dont la toxicité humaine pratique (risk) aiguë, subaiguë et chronique est strictement nulle. Loin de s'indigner de tels contresens, le toxicologue constate simplement les énormes dérives de l'information de vulgarisation par rapport aux connaissances scientifiques les plus simples.



**Professeur Christophe DUPONT**

Hôpital St Vincent de Paul - Service néonatalogie  
Assistance Publique des Hôpitaux de Paris

**Méthémoglobinémie et morbidité des nitrates :  
maladie du nourrisson – conséquences cliniques**

## A - Nitrates et nitrites

### 1. Pourquoi les nitrates sont ils dangereux pour le petit enfant

L'excès de nitrates est dangereux chez l'enfant de moins de 3 mois et peut même l'être jusqu'à 5 mois : les bactéries intestinales réduisent les nitrates en nitrites qui peuvent franchir la barrière intestinale à cet âge, parvenir dans la circulation où ils transforment l'hémoglobine en méthémoglobine. Dans l'hémoglobine, le fer, qui est l'élément essentiel de la fonction de transport de l'oxygène et du gaz carbonique, est bivalent : Fe<sup>++</sup> (fer ferreux). Les poisons méthémoglobinisants (nitrites, aniline, etc) le transforment en fer ferrique trivalent Fe<sup>+++</sup>, ce qui fait perdre toutes ses propriétés physiologiques à l'hémoglobine entraînant une méthémoglobinémie, potentiellement mortelle, en l'absence d'administration d'une substance réductrice par voie veineuse: bleu de méthylène ou acide ascorbique dans sa forme réduite.

### 2. Le risque d'intoxication de l'enfant

Le risque d'intoxication de l'enfant par les nitrates ne fait plus en France l'objet d'un intérêt considérable, probablement en raison de la bonne maîtrise de ce type d'intoxication à laquelle est parvenu notre pays.

Les dernières observations de méthémoglobinémie publiées en France remontent à 1983, date à laquelle ont été décrites (Blanc et al, Pédiatrie, 1983, 38: 87-99) 8 cas chez des enfants ayant présenté une diarrhée aiguë. Quatre d'entre eux avaient reçu pendant longtemps un apport exagéré en soupe de carotte riche en nitrite et nitrates. Quatre autres avaient présenté une diarrhée sévère, au cours de laquelle un mécanisme de nitrification endogène par prolifération microbienne était envisagé. Dans tous les cas le taux de méthémoglobinémie était faible, plus un symptôme qu'un facteur de risque, contrairement à ce qui est actuellement décrit dans de nombreux pays en voie de développement, comme par exemple 80 cas d'intoxication aiguë en Chine (Gao et Guo, Am J Emerg Med, 1991, 9: 200-201).

Le potentiel toxique des nitrates envers les fonctions de reproduction a également été envisagé. Une revue récente a montré que chez l'animal, le risque tératogène des nitrates n'était pas démontré et qu'un effet adverse sur la reproduction n'était observé qu'à une dose 1000 fois supérieure aux ingesta humain habituels (Fan et al, Regul Toxicol Pharmacol, 1987, 7: 135-148).

Pour autant le risque d'intoxication par les nitrates est-il si limité?

Ce risque est lié à la consommation de l'eau. L'eau est essentielle à la vie. Pour les enfants, ce besoin est encore plus considérable, estimé à 3 fois les besoins de l'adulte, compte tenu du poids corporel. C'est cette consommation élevée qui rend l'enfant plus sensibles aux intoxications insidieuses. Or la contamination de l'eau du sol et de l'eau potable en zone rurale à partir du bétail et des excréments humains reste un risque largement répandu dans le monde. Il n'est pas exclu que ce risque étant actuellement sous estimé, la méthémoglobinémie puisse ne pas être reconnue et ainsi responsable de certaines affections de l'enfant et notamment de certaines morts subites, comme cela a été rapporté au cours des années 80 dans certains états d'Amérique du Nord (Johnson et Cross, Am J Int Med, 1990, 18: 449-456).

La maîtrise de la qualité de l'eau potable demeure donc un enjeu considérable à travers le monde. Un équilibre correct, de bonnes qualités gustative, physique, chimique, bactériologique sont nécessaires pour la rendre potable. Une concentration maximum de 45 ppm d'ion nitrate ou de 10 ppm de nitrate azote semble de bonne efficacité protectrice pour le très jeune enfant (Fan et al, Regul Toxicol Pharmacol, 1987, 7: 135-148).

En France, deux lois concernant l'eau potable ont été promulguées récemment (janvier et juin 1989), l'une traitant de la consommation humaine et l'autre traitant de l'eau minérale. L'eau du robinet et l'eau minérale sont sous stricte surveillance. Pour les enfants de moins de 4 mois, il est recommandé d'utiliser de l'eau minérale, avec un compte minéral réduit, notamment un taux de nitrates inférieur à 15 mg/l. Les bouteilles en plastique sont aussi sûres que les bouteilles en verre.

**Docteur Brigitte PIGNATELLI**

Service des facteurs endogènes de risques de cancer  
International Agency for Research on Cancer (CIRC – OMS)  
LYON

**Risque de cancérogénicité des nitrates  
à long terme ?  
Éléments d'évaluation**

La question de savoir si l'exposition au nitrate peut constituer un facteur de risque de cancer pour l'homme est loin d'être résolue. La réduction du nitrate par une large variété de microorganismes peut produire des agents nitrosants susceptibles de générer des composés *N*-nitrosés (CNO) cancérigènes *in vitro et in vivo*.

Environ 90 % des 300 CNO étudiés induisent des tumeurs dans une grande variété d'organes chez 41 espèces animales incluant des primates et n'épargnent probablement pas l'homme. Les CNO figurent parmi les plus puissants cancérigènes connus et de faibles doses, parfois une seule, de ces CNO suffisent à induire des tumeurs chez l'animal. Les CNO exercent leurs effets cancérigènes après leur conversion métabolique (nitrosamines) ou non enzymatique (nitrosamides) en dérivés instables et réactifs qui constituent les cancérigènes ultimes. Les espèces actives alcoylantes formées sont de puissants électrophiles qui peuvent réagir avec les sites nucléophiles des macromolécules cellulaires telles que ADN, ARN et protéines. L'ADN constitue la cible cellulaire critique car certaines lésions non réparées avant la réplication peuvent conduire à des mutations. Celles-ci peuvent initier une transformation néoplastique. Les voies métaboliques des CNO, la formation d'adduits et les mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que les symptômes de toxicité aiguë apparaissent similaires chez l'animal et chez l'homme. Le cancer humain (leucémie aiguë non lymphocytaire) a été induit par des médicaments cytostatiques de la famille des nitrosourées utilisés en chimiothérapie. L'utilisation de tabac à chiquer serait responsable de l'accroissement de l'incidence du cancer de la cavité buccale avec une haute probabilité.

La réduction du nitrate en nitrite ou NO produit des agents nitrosants pouvant conduire aux CNO cancérigènes suite à leur réaction avec des substrats azotés. Ces agents ( $\text{NO}^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ , NOX) peuvent réaliser la nitrosation dans des conditions et milieux variés. Certaines bactéries, notamment présentes dans le suc gastrique humain, agissent comme catalyseurs efficaces de la réaction de *N*-nitrosation, et génèrent des CNO. Certains anions catalysent la formation des CNO, alors que d'autres composés, tels que les vitamines C et E, des composés phénoliques et mélanges naturels les contenant peuvent l'inhiber. En particulier, légumes et fruits sont très riches en composés inhibiteurs de la *N*-nitrosation. Alors que les nitrosamines volatiles et les nitrosaminoacides ont été beaucoup étudiés, la nature des CNO formés *in vivo* ou préformés dans l'environnement reste encore largement mal connue.

La réduction du nitrate est réalisée par une large variété de microorganismes. Certaines circonstances, par exemple de mauvaises conditions de stockage, accroissent la vitesse de transformation bactérienne du nitrate. Ainsi des produits naturellement riches en nitrate accumulent du nitrite, la formation de CNO pouvant survenir subséquentement. L'étude de l'absorption et du métabolisme du nitrate montre qu'il peut être une source de nitrite dans différents compartiments *in vivo*. Le nitrate ingéré est absorbé au niveau du tractus gastrointestinal dans la circulation sanguine. Il se trouve ensuite transporté pour environ 25 % jusqu'aux glandes salivaires. La réduction bactérienne dans la cavité buccale est affectée par le pH salivaire et la composition de la microflore, elle-même dépendante de la nutrition et de l'état de santé des personnes. Dans l'estomac, l'achlorhydrie permettant une colonisation bactérienne peut entraîner la présence de teneurs élevées de nitrite. Le nitrate peut aussi subir une réduction dans l'intestin grêle et la vessie. La biosynthèse endogène de NO et donc de nitrate est réalisée à partir de l'arginine par certaines cellules en réponse à une stimulation immunologique lors d'états inflammatoires ou infectieux. La synthèse endogène de CNO chez l'animal et chez l'homme a été largement démontrée, en particulier, grâce à la mesure de nitrosoproline et autres nitrosaminoacides dans l'urine. Des études ont permis de démontrer que : a) l'exposition au nitrate peut être corrélée à la capacité de nitrosation endogène ; b) la nitrosation endogène est modulée par des composés inhibiteurs tels que les vitamines C, E, les composés phénoliques et des mélanges naturels complexes ; c) la capacité de nitrosation endogène est corrélée à un taux élevé de cancers (estomac, oesophage) dans certaines populations ; d) La nitrosation endogène est plus élevée dans des états pathologiques associés à un risque accru de certains cancers.

Un grand nombre d'études épidémiologiques visant à mettre en évidence une corrélation entre le taux de mortalité ou l'incidence de certains cancers (estomac, oesophage) et l'exposition au nitrate ont été réalisées dans de nombreux pays. Des résultats contradictoires ont été obtenus. Ces divergences peuvent être expliquées par des difficultés liées à la mesure de l'exposition au nitrate,

telles que : a) la diversité des indicateurs et des méthodologies utilisés ; b) certaines habitudes alimentaires ; c) l'apport conjoint nitrate/vitamines, produits phénoliques et autres composés inhibiteurs de la nitrosation et modulateurs de la cancérogenèse ; d) les pollutions accompagnant celle du nitrate (pesticides, arsenic) ; e) la période de latence entre l'exposition au nitrate et la maladie ; f) les mouvements des populations. De plus, la nature de la source d'exposition au nitrate pourrait être d'importance capitale. En effet, alors que les légumes apportent conjointement au nitrate des éléments protecteurs, inhibiteurs de la nitrosation (e.g. vitamine C, polyphénols) l'eau, source possible de nitrate, est dépourvue de tels éléments. La corrélation entre l'exposition au nitrate et le risque de cancer de l'estomac peut varier en fonction du type de légumes, sources de nitrate (e.g. légumes verts par rapport aux céréales).

Le nitrate apparaît comme un élément parmi les multiples facteurs impliqués dans la formation endogène de CNO, en particulier : a) La capacité de réduction du nitrate en nitrite *in vivo* et l'étendue de la nitrosation bactérienne, dépendantes de l'existence, de la nature et de l'activité des bactéries dans la cavité buccale, dans un environnement gastrique achlorhydrique ou dans d'autres sites infectés comme la vessie; b) le flux salivaire ; c) la nature et la concentration des substrats nitrosables ; d) la présence de catalyseurs ou d'inhibiteurs de la nitrosation ; e) le pH du compartiment corporel concerné.

Les données actuelles des études épidémiologiques ne permettent pas de tirer une conclusion définitive quant au risque cancérogène dû à l'exposition à de fortes concentrations de nitrate. Des études du risque individuel de cancer en fonction de l'exposition individuelle au nitrate plutôt que des comparaisons globales seraient probablement plus informatives. L'exposition au nitrate pourrait constituer un élément nécessaire mais insuffisant du risque cancérogène qui dépendrait largement de facteurs individuels. Face à la complexité de la situation, aux informations disponibles largement incomplètes, à l'existence de certains groupes de population pouvant présenter une sensibilité particulière (achlorhydrie gastrique, infections microbiennes), ainsi qu'à la présence ubiquitaire de bactéries dans notre environnement, le risque ne peut pas être écarté. Il semble justifié de rechercher des moyens de prévention pour éviter l'exposition de l'homme au CNO notamment en limitant les concentrations de leurs précurseurs dans l'environnement et en particulier celles de nitrate. Il serait souhaitable d'éviter de trop fortes teneurs en nitrate dans les légumes pour conserver leurs effets bénéfiques en évitant un risque à long terme pour la santé humaine. Quant aux normes actuelles admissibles de nitrate dans l'eau, la prudence recommande leur maintien.

**- QUALIBIO -**

- QUALIBIO -

**Docteur Jean-Louis L'HIRONDEL**

CHRU CAEN

**Dualité des nitrates**

**Nitrates et méthémoglobinémie : essai de  
clarification sur la santé**

**NITRATES ET METHEMOGLOBINEMIE DU NOURRISSON  
ESSAI DE CLARIFICATION**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

Comme le précise en 1995 le Comité Scientifique de l'alimentation humaine de la Commission Européenne, l'ensemble des travaux épidémiologiques entrepris au cours des dernières décennies ont échoué dans leur tentative de démontrer une quelconque carcinogénicité des nitrates (EU, 1995). La réglementation des taux de nitrates dans l'eau de boisson n'a ainsi actuellement d'autre intention que de chercher à prévenir la méthémoglobinémie du nourrisson (WHO, 1993).

De ce fait, le thème nitrates-méthémoglobinémie du nourrisson est crucial ; il mérite d'être examiné de près.

Tentant d'apporter des éléments de clarification à un débat qui dure depuis plus de cinquante ans, l'auteur met l'accent sur quatre idées ou notions qui, quoique erronées, continuent à avoir cours.

Ces quatre idées erronées sont celles qui consistent à considérer :

- que les nitrates de l'alimentation peuvent être transformés en nitrites *in vivo* dans le tube digestif du nourrisson,
- que, dans un biberon contenant des nitrates, les nitrites commencent à apparaître dès le début de la prolifération bactérienne,
- que les données épidémiologiques relatives à l'eau de puits et au risque méthémoglobinémique qu'elle fait courir sont transposables à l'eau du robinet,
- enfin que les normes établies pour les taux de nitrates dans l'eau potable, donc entre autres dans l'eau du robinet, ont jadis été fondées sur des bases scientifiques solides.

Au contraire, comme le montrent les faits et données scientifiques rapportés par l'auteur,

- quand elle se produit et est à l'origine d'une méthémoglobinémie du nourrisson, ce qui est devenu de nos jours tout à fait exceptionnel, du moins aux Etats-Unis et en Europe Occidentale, la transformation nitrates-nitrites se fait dans le biberon, à l'occasion d'une faute d'hygiène caractérisée ;
- la transformation nitrates-nitrites dans le biberon ne commence à apparaître que lorsque la prolifération bactérienne est déjà très avancée ; le seuil de prolifération bactérienne au delà duquel la transformation nitrates-nitrites commence à apparaître se situe autour de  $10^7$  germes  $ml^{-1}$  ;
- quels qu'aient pu être par ailleurs ses concentrations en nitrates (en Europe, elles dépassent encore souvent la norme de  $50 \text{ mg NO}_3^- l^{-1}$ ), jamais l'eau du robinet, bactériologiquement saine et contrôlée, n'a été à l'origine du moindre cas, certain et vérifié, de méthémoglobinémie du nourrisson,
- enfin, la réglementation actuelle des taux de nitrates dans l'eau du robinet est consécutive à une interprétation défectueuse de l'enquête menée en 1949-1950 par l'American Public Health Association (1949-1950) ; le raisonnement qui la sous-tend est fondé sur un biais méthodologique.

Ainsi, quels que soient ses taux de nitrates, l'eau du robinet, qui est bactériologiquement saine avec moins de  $10^2$  germes  $ml^{-1}$ , ou à l'extrême rigueur moins de  $10^3$  germes  $ml^{-1}$ , ne fait courir aucun risque méthémoglobinémique au nourrisson. Par ailleurs, qu'ils viennent des légumes ou de l'eau de boisson, les nitrates alimentaires ne se montrent nullement cancérigènes. Actuellement l'accent est mis au contraire sur leurs effets bénéfiques. Les nitrates alimentaires exercent un important rôle protecteur à l'égard des infections digestives ; il est également possible qu'ils exercent un rôle protecteur à l'égard des maladies cardiovasculaires.

Les nitrates alimentaires ne sont pas nocifs. Ils sont au contraire bénéfiques. Lorsqu'elles en prendront conscience, les autorités sanitaires inverseront leur position en recommandant les alimentations et régimes richement nitrates.



## Nitrate and infant Methaemoglobinaemia - attempting to clarify the debate -

Jean Louis L'Hirondel

As the World Health Organisation states (WHO, 1993), "the Guideline value for nitrate in drinking-water is established solely to prevent methaemoglobinaemia".

The topic on nitrate and infant methaemoglobinaemia is of importance. The author attempts to clarify the issue in a debate that has lasted for fifty years; he lays stress on four statements that, though erroneous, are still currently expressed.

These four erroneous statements are as follows:

- Dietary nitrate can be reduced into nitrite *in vivo* in the infant digestive tract.
- In a feeding bottle containing nitrate, reduction to nitrite starts and occurs as soon as the bacterial proliferation begins.
- Epidemiological data on well water and risk of methaemoglobinaemia can be applied to tap water.
- Regulations for nitrate content in drinking water, especially in tap water, have been grounded formerly on solid bases.

On the contrary, as shown in this paper,

- The reduction of nitrate to nitrite that causes infant methaemoglobinaemia takes place in the feeding bottle as a result of a clearly unhygienic condition.
- For reduction nitrate-nitrite to start and occur in a feeding bottle, it is necessary for the bacteria to proliferate up to a threshold:  $10^7$  germs  $\text{ml}^{-1}$ .
- Whatever its nitrate concentrations, tap water, that is bacteriologically controlled, has never been responsible for a real and unquestionable case of infant methaemoglobinaemia.
- Finally, the official limits for nitrate content in tap water are based on the results of an American Survey (APHA, 1949-1950), that were subsequently misinterpreted; a methodological bias escaped then the attention of analysts.

- QUALIBIO -

**Professeur Nigel BENJAMIN**

Head of Department – Clinical Pharmacology  
St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine  
LONDON

**Nouveaux effets bénéfiques des nitrates**

- Assises ENVIROBIO 2000 -  
"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

- QUALIBIO -

La synthèse de l'oxyde nitrique consécutive à l'oxydation de l'arginine est maintenant bien connue. Nous avons recherché la possibilité que l'oxyde nitrique puisse être obtenu par des enchaînements de réduction, à partir de nitrate minéral, chez l'homme bien portant.

Les nitrates ingérés chez l'homme, proviennent principalement des légumes verts et de l'eau de boisson. A la suite de leur absorption dans l'estomac et la partie supérieure de l'intestin grêle, ceux-ci sont concentrés dans la salive, environ dix fois. Les nitrates salivaires sont rapidement réduits en nitrites, en présence de bactéries qui siègent à la surface de la partie inférieure de la langue. Ces bactéries sont anaérobies facultatives, et utilisent le nitrate comme accepteur d'électron en l'absence d'oxygène. Ceci entraîne des concentrations en nitrite élevées dans la salive, qui, après déglutition, est acidifié dans l'estomac. L'acidification des nitrites donne de l'acide nitreux qui se décompose spontanément pour former de très hautes concentrations d'oxyde nitrique. Nous avons nommé ce mécanisme « *circulation entéro-salivaire des nitrates* » (enterosalivary circulation of nitrate).

Suite à l'ingestion de 2mMoles de nitrate (dose contenue dans 50g de laitue), la concentration d'oxyde nitrique s'élève d'une valeur de base de 15 ppm à un pic de l'ordre de 100 ppm. Si ces nitrates sont donnés de même que de la laitue, l'augmentation d'oxyde nitrique beaucoup plus forte dans les gaz stomacaux, et peut atteindre plus de 400ppm chez certains sujets. Ces concentrations d'oxyde nitrique sont toxiques pour un grand nombre de microorganismes.

Nous disposons de preuves que l'objet de cette synthèse d'oxyde nitrique intragastrique porte sur la protection contre les agents pathogènes ingérés, mais également, pourrait jouer un rôle en maintenant un flux de sang dans la muqueuse gastrique. Un grand nombre d'agents pathogènes intestinaux, tels que Escherichia Coli et Salmonella sont éliminés par l'oxyde nitrique obtenu à partir des nitrites et de l'acide. Des premiers résultats chez des sujets exposés à des environnements contaminés semblent indiquer qu'une haute dose de nitrate ingérée peut protéger contre des infections dues à des aliments ou de l'eau souillés.

Nous avons également montré que la production d'acide nitrique sur la peau, était consécutive à la réduction des nitrates et nitrites, plutôt qu'à l'oxydation de l'arginine ; ceci peut, à nouveau, s'avérer fondamental dans la protection contre les infections. Nous avons montré que les nitrites de la salive, après application sur la peau, provoquent la production de grandes quantités d'oxyde nitrique, et nous en avons déduit l'hypothèse que l'oxyde nitrique produit pendant le léchage des plaies pouvait avoir un effet antimicrobien, grâce à ce mécanisme.

Plus récemment, nous avons étudié l'effet de l'application d'acides organiques et de nitrites sur des peaux humaines malades et nous avons mis en évidence que cette association était efficace pour soigner diverses maladies infectieuses de la peau.

De ces travaux, nous avons obtenu de nouvelles perspectives au sujet du nitrite minéral et de la santé humaine. Plutôt que d'être un « polluant », ou une substance toxique, il semble maintenant que les nitrates du régime constituent un composant essentiel d'un régime sain qui nous protège contre un grand nombre de maladies infectieuses. Des travaux récents ont confirmé que des individus qui consomment plus de nitrates sont également moins sujet à développer des cancers. Le danger pour les jeunes enfants de concentrations élevées de nitrates dans l'eau ont probablement été surestimés.

En conclusion, les réglementations qui limitent l'apport de nitrate des aliments et de l'eau de boisson doivent être réexaminées, en prenant en compte les effets bénéfiques potentiels d'un haut niveau d'ingestion de nitrate.

Nitric oxide synthesis resulting from arginine oxidation has been well characterised. We have been examining the possibility that nitric oxide can be generated by sequential reduction of inorganic nitrate in healthy humans.

Dietary nitrate in humans comes mainly from green vegetables and drinking water. Following absorption from the stomach and upper small intestine it is concentrated in saliva approximately 10 fold. Salivary nitrate is rapidly reduced to nitrite following contact with bacteria which inhabit the dorsal surface of the tongue. These bacteria are facultative anaerobes which use nitrate as a terminal electron acceptor instead of oxygen. This results in high concentrations of nitrite in saliva which, when swallowed, is acidified in the stomach. Acidification of nitrite results in the production of nitrous acid which spontaneously decomposes to form very high concentrations of nitric oxide. We have termed this mechanism "enterosalivary circulation of nitrate"

Following ingestion of 2mMoles of nitrate (the amount in 50g of lettuce), nitric oxide concentrations rise from a baseline of 15ppm to a peak of approximately 100ppm. If the nitrate is given as lettuce, the rise in nitric oxide concentration in the stomach headspace gas is much higher, with value up to 400ppm in some subjects. This concentration of nitric oxide is toxic to a large number of microorganisms.

We have evidence that the purpose of intragastric nitric oxide synthesis is to protect against swallowed gut pathogens, but also may have a role in maintaining gastric mucosal blood flow. A large number of human gut pathogens, including E. Coli and Salmonella are killed by nitric oxide generated from nitrite and acid. Preliminary results in humans exposed to contaminated environments suggest that a high nitrate intake may protect against infection from infected food and water.

We have also shown that nitric oxide production from the skin is due to nitrate and nitrite reduction, rather than from arginine oxidation, again this may be important in protection from infection. We have shown that nitrite from saliva, when applied to the skin causes the generation of large amounts of nitric oxide and we postulate that nitric oxide produced during licking of wounds may have an antimicrobial effect through this mechanism

More recently we have studied the effect of organic acids and nitrite application to diseased human skin and found this combination to be effective in curing a variety of infectious skin diseases.

From these studies we have gained a new perspective on inorganic nitrite and human health. Rather than being a "pollutant" or toxic substance, it now seems likely that dietary nitrate is an essential component of a healthy diet which will protect us against a variety of infectious diseases. Recent studies have confirmed that individuals who consume more nitrate are also less likely to develop cancer. The danger to young infants of high nitrate concentrations in water have probably been overestimated.

In conclusion, the regulations which limit the amounts of nitrate in food and drinking water need to be reassessed, taking into account the potential benefits of a high nitrate intake.

**Professeur Martine KAMMERER**

Laboratoire de toxicologie animale et environnementale  
Ecole nationale vétérinaire de Nantes

POTENTIALITE DES NITRATES POUR LES ANIMAUX DOMESTIQUES

Ou

**Quelle toxicité chez l'animal ?**

## Plan de l'exposé

1. Les accidents de méthémoglobinémie liés au nitrate rencontrés chez les animaux domestiques
  2. Quels effets à long terme ?
    - 2.1 Observations sur le terrain (bibliographiques et personnelles)
    - 2.2 Etudes expérimentales
      - 2.2.1 Données bibliographiques
        - sur les rongeurs de laboratoire
        - sur les animaux domestiques
      - 2.2.2 Essais réalisés à l'ENVN sur le lapin
  3. Une évaluation particulièrement difficile
- Conclusion

La toxicité aiguë de l'ion nitrate est bien connue des vétérinaires, mais elle s'exerce dans des conditions bien différentes de ce qui est observé dans l'espèce humaine. En effet, la méthémoglobinémie est observée essentiellement chez les ruminants adultes, principalement les bovins, lorsqu'ils consomment, non pas de l'eau mais des fourrages très riches en nitrate (au moins 5000 ppm/MS). La physiologie digestive très particulière des ruminants permet une réduction massive de l'ion nitrate en nitrite grâce aux microorganismes du rumen, et donc un effet méthémoglobinisant rapide qui est souvent fatal. Mais les très jeunes ruminants, contrairement aux enfants en bas âge, ne constituent pas une population particulièrement vulnérable et peuvent être nourris par du lait reconstitué préparé avec de l'eau riche en nitrate sans effets défavorables. Cette bonne tolérance est vraisemblablement à mettre en relation avec l'efficacité des enzymes permettant la réduction de la méthémoglobine dans les globules rouges du veau. Chez les autres espèces, la question du risque pour les nouveau-nés ne se pose pas, car ils sont nourris par le lait maternel très pauvre en nitrate.

Les risques à moyen ou long terme d'une teneur en nitrate excessive dans l'alimentation et surtout l'eau d'abreuvement, sont en revanche encore mal précisés. Sur le terrain, un certain nombre d'observations chez des animaux de rente consommant de l'eau renfermant quelques centaines de mg/L de nitrate évoquent un effet défavorable sur la croissance, la fertilité ou la résistance aux infections. Cependant, ces suspicions épidémiologiques ne sont pas confirmées par les études expérimentales.

Ces études ont été réalisées principalement chez les rongeurs de laboratoire, le plus souvent chez le rat. Un effet néfaste sur la croissance est bien retrouvé, mais avec des posologies quotidiennes très élevées, supérieures à 500 mg/kg PV. Des effets antivitaminiques A et E ont aussi été observés, ainsi qu'une action hypothyroïdienne qui s'expliquerait par la perturbation du métabolisme de l'iode.

Ces effets défavorables ont été également mis en évidence chez diverses espèces d'animaux domestiques, avec une concentration dans la ration nettement supérieure cependant à celle que l'on peut relever sur le terrain dans le contexte de pollution de l'environnement que nous connaissons. Chez les ruminants, la part de l'eau d'abreuvement dans l'apport de nitrate est très minoritaire par rapport à celle de la ration fourragère. Une augmentation discrète de sa concentration ne modifie pas de façon sensible l'apport global. De plus, cet apport étant fractionné, il ne conduit pas à une résorption importante de nitrites en raison de leur réduction subséquente en ammoniac et protéines par la microflore ruminale. Si les ruminants représentent une population à risques en matière d'intoxication aiguë, ils semblent en revanche être peu concernés par les effets à long terme.

Les volailles tolèrent également une concentration élevée dans la ration ou l'eau de boisson. C'est chez le porc que la tolérance semble moins bonne, et la pollution de l'eau est parfois mise en cause dans le développement des infections urinaires. Un éventuel effet cancérigène n'a jamais été envisagé à partir d'observations chez les espèces de rente; ce n'est pas une préoccupation des vétérinaires, car la courte durée de vie de ces animaux ne permettrait vraisemblablement pas son expression s'il devait se manifester.

Afin d'apporter une contribution à la connaissance des effets des nitrates à moyen et long terme, le Laboratoire de Toxicologie de l'ENVN a conduit (de 1990 à 1995) des études expérimentales chez le

- QUALIBIO -

lapin. Plusieurs lots d'animaux ont été abreuvés pendant des périodes d'environ 6 mois, avec de l'eau renfermant de 120 à 600 mg de nitrate par litre. Les animaux ont fait l'objet d'examens approfondis portant en particulier sur la croissance, la reproduction, la teneur en vitamine A hépatique, le fonctionnement de la thyroïde, la réponse immunitaire. Globalement, les essais ont révélé la bonne tolérance des lapins aux concentrations testées.

Il faut souligner cependant les difficultés particulières d'évaluation de la toxicité de l'ion nitrate. En effet, l'extrapolation des résultats expérimentaux aux conditions d'exposition réelles, ne permet pas de tenir compte de l'intervention des microorganismes contaminant éventuellement le substrat alimentaire et conduisant à l'apparition de nitrite toxique. D'autre part, les données expérimentales concernant l'effet méthémoglobinisant chez les nouveau-nés animaux sont malheureusement peu utiles pour évaluer le risque pour le nourrisson car il semble bien que celui-ci soit plus sensible que les espèces animales disponibles pour les essais.

Enfin, les essais conduits chez le rat, de loin les plus nombreux, sont parfois remis en cause pour estimer le risque chez l'Homme, en raison de la faible élimination salivaire de nitrate/nitrite chez cette espèce contrairement à ce qui est observé chez l'Homme.

Au bilan, on peut considérer que les effets néfastes de l'ion nitrate ne se manifestent chez les animaux domestiques qu'à des posologies élevées, ce qui conduit à tolérer une teneur en nitrate dans l'eau d'abreuvement des animaux de rente nettement supérieure à la CMA de l'eau potable, les propositions allant jusqu'à 450 mg/l.

Cette teneur peut être acceptable dans l'eau de boisson des animaux, mais se révèle en revanche très dangereuse pour d'autres espèces animales, celles dont c'est le milieu de vie, en particulier les amphibiens.

Acute nitrate toxicity is well known in veterinary medicine, but circumstances are not the same as in human. Indeed, methemoglobinemia is observed essentially in adult ruminant, above all in cattle, after consuming nitrate containing forage (above 5000 ppm /MS), rarely after contaminated water ingestion. The anatomy and microflora of ruminant animals allows the in vivo reduction of nitrate to nitrite and methemoglobinemia formation occurs rapidly. But very young cattle, contrary to infants, are not particularly vulnerable and milk replacer can be prepared with high nitrate water without toxic effects. This is probably on account of enzyme activity which allows methemoglobin reduction in calf erythrocytes. In other species, risk for newborns is not a problem because they are given mother milk, which is very poor in nitrate.

On the other hand, mild and long term effects of high nitrate food or water are still not clearly defined. On the field, detrimental effects on growth, fertility or immune defences were observed in livestock drinking water containing several hundred mg/L nitrate. However, these epidemiological suspicions are not confirmed by experimental studies. These studies have been conducted principally in laboratory rodents, often in the rat. Decreased weight gain has been noted, but with high dosages, above 500 mg/kg/d. Hypovitaminosis A and E has been described, as also a impairment of thyroid function, which could be related to disturbance of iodide metabolism. These harmful effects have also been related in various domestic species, but at nitrate levels in diet really above those one can observe actually in environmental pollution. For ruminants, drinking water brings much less nitrate than do forages. A slight increasing of nitrate concentration in water don't lead to perceptible increase in whole intake. Moreover, this intake is divided, and therefore don't lead to large resorption of nitrites, which are reduced in ammonia and proteins by digestive microflora. In fact, cattle is very susceptible to acute intoxication but not to long term hazards. Poultry tolerate also high levels of nitrate in drinking water or food. But pigs should be more sensitive and high nitrate water could promote urinary infections.

Nitrate ingestion has never been involved in the aetiology of cancer in livestock, but cancer is very rare in these species, which are slaughtered after very short life.

In order to contribute to the knowledge of chronic nitrate toxicity, the Laboratory of Toxicology of ENVN conducted (for 1990 to 1995) experimental studies in rabbits. Several groups of animals were supplied for about 6 months with water containing 120 to 600 mg/L nitrate. Growth, reproduction, liver vitamin A stores, thyroid function, immune response were followed. No detrimental effect was observed.

Evaluation of nitrate toxicity is however difficult, because experimental results don't take into account microorganisms which can be present in water or food, and which are able to reduce nitrate to nitrite. Moreover, these studies are not interesting in order to evaluate risk for baby, who should develop methemoglobinemia more quickly than animal species. In other respects, studies in rat with the object of risk assessment in human are sometimes controverted, because elimination of nitrate/nitrite in saliva is much lower in rat than in human.

In domestic animals, it is possible to tolerate nitrate concentration in drinking water higher than what is accepted in human. Proposed values can reach 450 mg/L.

This level is acceptable for drinking water but could be very dangerous for animals which live in water, especially amphibians.



Principales références bibliographiques

ADAMS AW. 1974 - Effects of nitrate in drinking water in japanese quail Poultry Sci 48, 1222-1229

ALAVANTIC D., SUNJEVARIC I., PECEVSKI J., BOZIN D., CEROVIC G. 1988 – In vivo genotoxicity of nitrates and nitrites in germ cells of male mice 1. Evidence for gonadal exposure and lack of heritable effects. Mutat Res 204, 689-695

ANONYME 1998 - Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau . Les études des Agences de l'eau n° 64 - Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement , Direction de l'Eau - Paris

BERENDE PLM., TERLUIN RW., VAN DER WAL P. 1979 - High doses of nitrate in rations for milk-fed calves. Z Tierphysiol Tierer Nñhr u. Futtermittelkde 42, 312-321

BRUNNING-FANN cs., KANEENE JB. 1993 - The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on animal health. Vet Hum Toxicol 35, 237-253

GREEN LC., TANNENBAUM SR., GOLDMAN P. 1982 - Nitrate in human and canine milk N Eng J Med 306, 22, 1367-1368

GRUENER N., SHUVAL HI., BEHROOZI K., COHEN S., SCHECHTER H. 1973 - Methemoglobinemia induced by transplacental passage of nitrites in rats Bull Environ Contamin Toxicol 9, 1, 44-48

JAHREIS G., HESSE V., SCHONE F., HENNING A., GRUHN K. 1986 - Effect of chronic dietary nitrate and different iodine supply on porcine thyroid function, somatomedin-C-level and growth Exp Clin Endocrinol 88, 242-248

KAMMERER M. SILIART B. 1993 - Toxicité à moyen terme des nitrates : Evaluation expérimentale des effets sur les fonctions de reproduction chez la lapine Ann Rech Vet 24, 434-444

KAMMERER M., PINAULT L. 1998 - Effect of added drinking water nitrate on the vitamine A status of rabbits. Vet Human Toxicol 40, 197-199

LHUISSIER M., SUSCHETET M., CAUSERET J. 1976 - Influence des nitrites et des nitrates sur certains aspects de l'état de nutrition vitaminique Ann Nutr Alim 30, 847-858

MARCO A.,QUILCHANO C.,BLAUSTEIN AR. 1999 - Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the pacific northwest USA. Environ Toxicol Chem 18, 2836-2839

ROUSE JD., BISHOP CA., STRUGER J. 1999 - Nitrogen pollution : An assessment of its threat to amphibian survival. Environ Health Perspect 107, 799-803

SORENSEN MT., JENSEN BB., POULSEN HD. 1994 - Nitrate and pig manure in drinking water to early weaned piglets and growing pigs Livestock Production Science 39, 223-227

SMITH JE., BEUTLER E. 1966 - Reduced diphosphorydine nucleotide dependant diaphorase in f\_tal, newborn and adult calves Nature 13, 5050, 756-757

YERUHAM I.,SHLOSBERG A.,HANJI V., BELLAICHE M., MARCUS., LIBERBOIM M. 1997 - Nitrate toxicosis in beef and dairy cattle herds due to contamination of drinking water an whey. Vet Human Toxicol 39, 296-298

**Docteur Jean-Marc LACORTE**

INSERM

Maître de conférences Universitaire

Praticien Hospitalier

Assistance Publique des Hôpitaux de Paris

**Nitrates et alimentation : le nitrate dans  
l'alimentation, bon ou mauvais ? Effets fruits et  
légumes : arguments épidémiologiques et  
biologiques**

Un certain nombre de pathologies comme le cancer ou les maladies cardio-vasculaires ont dans leur genèse à la fois une part génétique et une part liée à l'environnement, qui peuvent d'ailleurs influencer l'une sur l'autre. Depuis les années 1970 et les études épidémiologiques de Keys comparant la fréquence des accidents cardio-vasculaires dans différentes populations et leur alimentation, est né le concept du régime méditerranéen. Ainsi, il a été mesuré qu'un régime riche en fruits et légumes, associant des acides gras polyinsaturés et une ration calorique globalement plus faible pouvait diminuer le risque de maladies cardio-vasculaires par 4 en Grèce par rapport aux Etats-unis. Depuis, de très nombreuses études portant tant sur la maladie athéromateuse que sur les cancers ont confirmé ces résultats. Dès lors, l'on a cherché à identifier quels constituants pouvaient être responsables de ces effets protecteurs et par quels mécanismes. Il apparaît démontré que pour l'essentiel, c'est le rôle antioxydant de vitamines (C, A et E) et de certains micronutriments comme les polyphénols présents en grande quantité dans les végétaux qui jouent un rôle bénéfique pour la santé. Ces résultats ont conduit certains à développer des études afin de mesurer l'effet de ces molécules apportées isolément et en supplémentation dans l'alimentation. Force est de constater que pratiquement aucune ne montre aujourd'hui un effet préventif. Actuellement, une vaste étude française, SU.VI.MAX, tente d'évaluer l'efficacité d'une supplémentation en vitamines antioxydantes et en minéraux à des doses nutritionnelles, mais ne sera exploitable qu'à partir de 2002. Toutefois, quels que soient les résultats et sans qu'il soit nécessaire, en particulier dans nos pays à haut niveau de vie, de recourir à une alimentation substitutive, il apparaît qu'une alimentation variée et riche en fruits et légumes permet de diminuer le risque de survenue de cancer, de maladies cardio-vasculaire ainsi qu'un meilleur contrôle de la tension artérielle, de l'obésité et du diabète. Cependant n'oublions pas que ces effets actuellement démontrés résultent d'une « exposition » sur plusieurs dizaines d'années. Aura-t-on dans 20 ans les mêmes résultats si l'environnement se modifie ?

- QUALIBIO -

**Professeur Marian APFELBAUM**

Faculté de médecine Xavier BICHAT  
PARIS

**Perspectives de sécurité sanitaire  
et gestion des risques**

Comme nous le verrons au cours du colloque, les données historiques, l'expérimentation animale, l'expérimentation aiguë humaine, et l'épidémiologie permettent de conclure que la consommation de nitrates est inoffensive chez l'homme sans limite de dose. Seule, une erreur d'interprétation ancienne d'un demi-siècle, et depuis unanimement reconnue comme telle, est à l'origine d'une réglementation internationale, européenne et française sur la teneur en nitrates des eaux de boisson, totalement inadéquate à la réalité scientifique.

Cette réglementation comporte de surcroît une contradiction interne : tous les légumes contiennent de fortes quantités de nitrates, approximativement 2 grammes par kilo dans la laitue, les épinards, la betterave ; bien davantage dans les navets, la scarole ; moins dans d'autres légumes. Or, la consommation de légumes est recommandée, à la suite de travaux épidémiologiques dont les résultats sont convergents, par les diverses instances, les mêmes qui déclarent l'eau de boisson dangereuse au dessus de 50 milligrammes par litre.

Ce colloque est une véritable expérience en termes de gestion de risques : nous aurons à dire que le roi est tout nu, que la réglementation est absurde en matière de nitrates, et que donc elle devrait être abolie, alors que l'opinion publique, et donc le monde politique, réclament davantage de réglementation dans le domaine alimentaire.

Nous nous trouvons devant une alternative : soit le monde est convaincu par notre discours, et les réglementations abolies au nom de la vérité scientifique ; soit, il ne se passera rien, au nom de la sécurité politique .....

As we shall see during this symposium, the data of history together with animal experimentation, acute human experimentation and epidemiology as well, all allow the conclusion that consumption of nitrates is harmless in Man, with no dose limitation.. Only a half century old error in interpretation, now unanimously recognised as such, gave birth to a series of international, European, and French regulations on the level of nitrates allowed in drinking water, even though they are totally inadequate in regard of scientific reality.

The regulation comprises a further internal contradiction: all vegetables contain great quantities of nitrates, about 2 g per kilo in lettuce, spinach or beet; still more in turnips and endive; somewhat less in other vegetables. Yet, consuming vegetables is strongly recommended, according to the convergent results of epidemiological studies, this recommendation being stated by those same authorities which declare drinking water dangerous above 50 mg per litre.

This symposium is a veritable experiment in terms of risk management: we are going to say that the King is naked, that the regulation on nitrates is absurd, that it should be suppressed, all this while Public Opinion and therefore the political world are calling for still more regulations in the field of alimentary safety. We are thus faced with an alternative: either the world is convinced by what we say, and the regulation abolished in the name of scientific truth; or, nothing at all happens, in the name of political security.

## **Table Ronde**

Animée par les professeurs Marian APFELBAUM, Nigel BENJAMIN,  
Christian CABROL et Maurice TUBIANA

**Quel impact sanitaire pour les nitrates ?  
Quelle alimentation préconiser ?**

## MODULE 2

<b>NITRATES CYCLE BIOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENT</b>
---

**Présidents de séance :**

**Docteur Max THIBAULT :**

*Association pour la promotion, l'Etude et la Protection des Ecosystèmes Aquatiques  
– FOUGERE*

**Monsieur Jean-François PROUST :**

*Comité Economique Régional Agricole "Fruits et Légumes" CERAFEL - Morlaix*

- QUALIBIO -

**Monsieur Guy BARROIN**

Chargé de Recherches - INRA  
Station d'hydrobiologie lacustre de Thonon Les Bains

**Phosphore, Azote et dégradation des eaux douces**

- Assises ENVIROBIO 2000 -  
"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"



C'est à partir des substances minérales dissoutes dans l'eau que les algues synthétisent leurs tissus. Du point de vue de la structure, le carbone est le composant principal, venant bien sûr après l'hydrogène et l'oxygène. Mais c'est le phosphore qui, en conditions naturelles, est le tout premier nutriment à faire défaut pour assurer la synthèse de nouveaux tissus., avant l'azote et le carbone. Le **phosphore** est dit « facteur **limitant** », notion empruntée à l'agronomie. C'est également le facteur de **maitrise** puisque c'est en agissant sur lui qu'il est possible d'augmenter ou de réduire les proliférations algales.

En déversant dans le réseau hydrographique des quantités considérables de phosphore, les activités humaines, qu'elles soient domestiques, industrielles ou agricoles, lui font perdre son statut de facteur limitant au profit de l'azote. Cette situation de carence azotée stimule la prolifération d'algues particulières (cyanobactéries) capables de fixer l'azote moléculaire dont l'atmosphère constitue une réserve quasi inépuisable. Une fois métabolisé cet azote se retrouve dans le milieu aquatique et participe à son fonctionnement au même titre que les autres apports. D'autres espèces cyanobactériennes vont également se développer en raison cette fois-ci de leur aptitude à proliférer dans les conditions d'éclairement réduit qu'entraîne la prolifération algale, toutes espèces confondues.

Outre leurs remarquables facultés d'adaptation, les cyanobactéries ont une taille, une consistance et une toxicité qui empêchent les prédateurs potentiels (zooplancton herbivore) de les consommer. Elles finissent donc par dominer le peuplement algal modifiant le fonctionnement du réseau trophique au point de nuire aux divers usages attendus de l'eau : le développement de conditions anoxiques entraîne l'élimination de toutes les formes supérieures de la vie, à commencer par les poissons de qualité (salmonidés), l'anoxie de l'interface eau/sédiment entraîne la réduction des composés du fer et le relargage du phosphore qu'ils piégeaient lequel vient s'ajouter aux apports du bassin versant pour intensifier le processus de dégradation, l'envahissement de la colonne d'eau par les cyanobactéries pose de gros problèmes de qualité d'eau, la présence de toxines cyanobactériennes n'étant pas des moindres.

Cette inéluctable dégradation en réponse à la pollution par les phosphates se manifeste d'autant plus intensément que le caractère stagnant des eaux est prononcé. Il ne faudrait cependant pas utiliser cette influence primordiale de la stagnation du milieu pour réserver un traitement préférentiel à des zones dites « vulnérables », abandonnant le reste du territoire à une pratique de la déphosphatation à l'économie. En effet, l'extrême solidarité du réseau hydrographique fait que de telles mesures discriminatoires ne peuvent qu'engendrer la généralisation de la dégradation des eaux stagnantes ou ralenties selon un gradient amont/aval, l'aval ultime étant la mer.

En conditions fortement anthropisées, l'**azote** étant facteur **limitant** des proliférations algales, leur augmentation peut être obtenue en ajoutant de l'azote, certes, mais aussi du phosphore du fait de l'apport automatique de l'azote manquant par les cyanobactéries fixatrices d'azote. Quant à vouloir ramener les proliférations algales au voisinage de ce qu'elles étaient avant la pollution par les phosphates (quand le phosphore était limitant), seule peut y arriver une réduction du phosphore, vouloir intervenir sur l'azote nécessiterait de le rendre plus limitant que le phosphore à un niveau de concentrations proche du naturel. Sans doute la pollution par les phosphates fait-elle de l'**azote** le facteur **limitant**, mais c'est toujours le **phosphore** qui est le facteur de **maitrise**.

Lutter contre les nitrates pour résoudre le problème de l'eutrophisation est donc une solution à la fois pratiquement impossible (nécessité de rendre l'azote plus limitant que le phosphore au voisinage des concentrations naturelles), écologiquement dangereuse (stimulation des cyanobactéries), techniquement inefficace (réinjection automatique par les cyanobactéries de l'azote que l'on s'efforce d'éliminer) et rationnellement indéfendable (on propose de lutter contre la pollution par les phosphates en traquant les nitrates !)

Non seulement les nitrates ne sont pas la bonne cible mais leur présence contribue à traiter deux conséquences néfastes de la pollution par les phosphates : leur azote remonte le rapport N/P empêchant ainsi l'apparition des fixatrices d'azote, leur oxygène entretient l'oxydation des composés du fer à l'interface eau/sédiment empêchant ainsi le relargage du phosphore associé.

En fait, si l'azote entraîne des nuisances dans les milieux aquatiques, ce n'est pas pour son rôle « eutrophisant » à l'état nitrique mais pour sa toxicité à l'état ammoniacal. En effet, en plus de la consommation d'oxygène qu'entraîne la nitrification de l'azote ammoniacal, celui-ci est toxique sous sa forme non dissociée  $\text{NH}_3$ . En conditions naturelles, les risques de toxicité sont très faibles car les concentrations d'azote ammoniacal le sont également. Par contre, en conditions anthropisées, les risques augmentent considérablement par suite des multiples déversements d'effluents peu ou pas traités contenant cette forme d'azote, dans les urines notamment. De plus, l'accroissement du pH favorisant la forme  $\text{NH}_3$  toxique, les eaux les plus touchées sont celles où la photosynthèse,

- QUALIBIO -

consommatrice de CO<sub>2</sub>, est la plus active, donc celles où les algues prolifèrent le plus et par conséquent celles où le phosphore est le plus abondant.

*Pour en savoir plus*

- BARROIN G.**, 1985 - La dénitrification en milieu lentique. - Rev. fr. sci. eau, 4, p. 79-92. (251)  
**BARROIN G.**, 1990 - La pollution des eaux par les phosphates. La Recherche, 221, p. 620-627. (367)  
**BARROIN G.**, 1991 - La réhabilitation des plans d'eau. La Recherche, 238, p. 1412-1422. (414)  
**BARROIN G.**, 1995 - Les phosphates ou comment manipuler la science. La Recherche 281, 56-60.  
**BARROIN G.**, DORIOZ, J.M., DURAND P., MEROT P., 1997 - Entraînement de l'azote dans les eaux de surface et conséquences sur les écosystèmes aquatiques. Colloque « maîtrise de l'azote dans les agrosystèmes » Reims, 19-20 nov. 1996. Ed. INRA. Les Colloques n° 83, 39-53.

**- QUALIBIO -**

## **ATELIERS THEMATIQUES**

**- Assises ENVIROBIO 2000 -  
"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"**

- QUALIBIO -

**Ateliers 1 :**

**Docteur Jean-Luc BURGAUD**

Société NICOX

**Dérivés nitrés en Pharmacie**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

## Assises Internationales ENVIROBIO: 13-14 novembre 2000 – Paris

Dr. J.L. Burgaud, NicOx, B.P. 313, 1900 route des crêtes, 06906 Sophia-Antipolis.

NicOx est une société biopharmaceutique qui développe de nouveaux produits avec des profils de sécurité et d'efficacité améliorés par l'exploitation des propriétés de monoxyde d'azote (NO). L'approche innovante de NicOx consiste à exploiter les propriétés bénéfiques du NO en greffant sur des médicaments existants une structure libérant de l'oxyde nitrique dans les tissus et le sang de façon prolongée et contrôlée. L'objectif du développement de ces molécules chimiques est triple:

- diminuer les effets secondaires des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) notamment au niveau du tractus gastro-intestinal et rénal,
- améliorer le profil pharmacologique de ces substances, et enfin,
- obtenir de nouveaux effets pharmacologiques et donc de nouvelles applications thérapeutiques.

L'exposé portera sur la présentation des avantages d'une telle stratégie en s'appuyant sur les résultats obtenus avec le produit phare de NicOx, la nitro-aspirine ou NCX 4016.

Cette nouvelle entité chimique est un dérivé nitré de l'Aspirine. La molécule est composée de l'acide acétylsalicylique, d'un pont chimique estérifié et d'une entité capable de libérer du NO ( $\text{ONO}_2$ ) par hydrolyse enzymatique du pont chimique (1). Cette structure ne peut donc en aucun cas être considérée comme une pro-drogue, le NO comme l'aspirine possédant une activité pharmacologique. On parle donc d'une nouvelle entité chimique.

Le premier aspect de cette présentation concernera la pharmacocinétique du produit. La demi-vie de l'acide acétylsalicylique étant très courte et le produit étant difficilement dosable, nous suivons donc le devenir du NCX 4016 en dosant au niveau sanguin le taux de ces 2 principaux métabolites, l'acide salicylique et les nitrites/nitrates. Nous observons, quelque soit le composé dosé, une homologie dans les tracés. En effet, les pics sériques du salicylate et des nitrates apparaissent dans un délai de 6 heures tandis que les nitrites sont absents (2). On note ici l'importance de la libération lente du  $\text{ONO}_2$ , qui évite une augmentation rapide du taux plasmatique de NO, ce qui aurait pour conséquence, comme nous le verrons plus loin, d'entraîner une vasodilatation massive responsable d'une hypotension.

Afin de vérifier que le  $\text{ONO}_2$  libère correctement du NO, nous avons mesuré ex vivo le taux de GMP cyclique intraplaquettaire. Nous constatons ici que le taux augmente lentement, mimant parfaitement les courbes des nitrates.

Nous avons bien entendu comparé la cinétique du NCX 4016 à celle d'un donneur conventionnel de NO, la S-nitroso-N-acétyl-penicillamine sur des monocytes humains. Nous avons ainsi constaté et confirmé la libération lente et prolongée du NO pour le NCX 4016 tandis que le SNAP montre une libération beaucoup plus rapide et beaucoup plus massive de NO. Cette constatation s'avère confirmée que l'on regarde l'évolution du taux des nitrates, du taux de GMP cyclique intracellulaire ou l'apparition intracellulaire de fluorescence en utilisant la technique du DAF-2DA (3).

Des études de pharmacocinétique nous ont également permis d'élucider une partie du processus métabolique propre à nos composés. L'administration orale d'une dose unique de 200 mg/kg de NCX 4016 chez le rat a permis de montrer la formation de HB-NO (nitroso-hémoglobine); cette formation étant maximale à 6 heures et disparaissant après 24 heures.

La concentration maximale de salicylates atteinte est de 8  $\mu\text{g/ml}$ . Cette concentration plasmatique est dans tous les cas supérieure aux concentrations effectives du composé obtenues dans différents modèles expérimentaux.

Au niveau du tractus gastro-intestinal, de nombreuses études ont démontré que l'utilisation d'AINS représentait un facteur d'agression notamment pour la muqueuse gastrique. Ceci s'explique par le fait que les AINS inhibent totalement la synthèse de prostaglandines au niveau de l'estomac. Il en résulte une diminution de flux sanguin engendrant ainsi une baisse de la production de bicarbonate et du mucus. Il en découle obligatoirement une lésion de la muqueuse gastrique (4).

Bien que les NO-AINS inhibent la synthèse de prostaglandines, ils permettent, par l'effet du NO, de maintenir la sécrétion de bicarbonate et de mucus, évitant ainsi la lésion de la muqueuse gastrique. Cette protection du tractus gastro-intestinal se retrouve également lorsque nous comparons

les effets des NO-AINS avec ceux des inhibiteurs spécifiques de la COX-2 chez l'animal âgé, les NO-AINS démontrant des effets plus bénéfiques (5).

Le deuxième objectif du développement des NO-AINS est d'améliorer les effets pharmacologiques des produits. Nous avons donc comparé les effets pharmacodynamiques de NCX 4016 à ceux de l'aspirine. Ces études ont porté sur les effets anti-inflammatoires, analgésiques, anti-thrombotiques et anti-prolifératifs de ces deux composés. Dans tous les cas la nitro-aspirine s'est révélé un composé plus efficace que l'aspirine:

- dans un modèle expérimental d'inflammation in vivo, le NCX 4016 montre un effet anti-inflammatoire 10 fois supérieur à celui du composé natif,
- le NCX 4016 a montré également une plus grande efficacité que l'aspirine à prévenir le thromboembolisme chez la souris. Cet effet s'explique en majorité par l'action du NO au niveau des plaquettes, une augmentation prolongée du taux de GMP cyclique dans celles-ci étant responsable de l'inhibition de l'agregation et de l'adhésion plaquettaire, l'aspirine étant dépourvue d'activité sur l'adhésion plaquettaire.

En résumé, la nitro-aspirine joue donc un rôle primordial au niveau du système cardio-vasculaire. De part ses actions combinées aspirine et NO, elle permet d'inhiber la vasoconstriction, la dégranulation des mastocytes, l'agregation et l'adhésion plaquettaire, la migration des neutrophiles et des lymphocytes, l'infiltration des macrophages et enfin diminuer le chimiotactisme pour les neutrophiles (6).

De plus, des études complémentaires ont permis de confirmer que le NCX 4016 inhibe la prolifération des cellules musculaire lisses vasculaires, démontrant ainsi un intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de la sténose après angioplastie. Ce dernier phénomène trouve une explication dans la faculté que possède NO-aspirine à inhiber la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (7).

Mais le portefeuille de produits en développement chez NicOx ne s'arrête pas à la nitro-aspirine. Il comprend des futurs médicaments pour le traitement de nombreuses pathologies. On compte parmi ces produits le HCT 1026, un dérivé nitré de l'AINS flurbiprofène, qui est en essai clinique de phase II pour deux affections fréquentes chez la femme ménopausée, l'incontinence urinaire et l'ostéoporose. Une première étude pilote de phase II a démontré une amélioration des paramètres urodynamiques et des symptômes cliniques associés à une vessie neurogène. De plus, le développement clinique d'une formulation pour usage local du HCT 1026 pour des affections dermatologiques telles que le psoriasis et la dermatite atopique est en cours. Le NCX 1015 est un dérivé nitré du stéroïde prednisolone. Cette molécule est en phase de développement pour le traitement des entéropathies inflammatoires chroniques. Il a été démontré sur des modèles animaux que le NCX 1015 est plus efficace dans la diminution de l'inflammation des tissus que les stéroïdes conventionnels. De plus, NicOx évalue actuellement NCX 1020 et d'autres NO-stéroïdes pour le traitement des maladies respiratoires telles que l'asthme. Des résultats préliminaires ont démontré, sur différents modèles animaux, une plus grande activité bronchodilatatrice du NCX 1020 comparativement au composé parent.

On compte parmi les produits phare de NicOx le NCX 701, dérivé du paracétamol. La greffe d'un molécule de monoxyde d'azote à ce produit permet de le doter d'une activité analgésique plus puissante, ce produit possède en outre une activité anti-inflammatoire contrairement au produit parent. De plus, des études précliniques ont démontré une réduction de la toxicité hépatique et rénale (8).

Tous ces exemples montrent l'intérêt grandissant de l'utilisation du monoxyde d'azote dans l'industrie pharmaceutique. Les produits développés par NicOx sont un exemple de l'utilisation possible des nitrates pour obtenir un effet bénéfiques sur l'organisme. Cette notion est la parfaite application au niveau industriel de la découverte des Professeurs Ignarro, Murad et Furchgott, Lauréat du Prix Nobel en 1998 pour leur recherche sur le monoxyde d'azote comme importante molécule messenger dans l'organisme.

## References

- 1- NO-aspirins, a class of new anti-inflammatory and antithrombotic agents.  
*Del Soldato P., Sorrentino R. and Pinto A.*  
Trends Pharmacol. Sci. 1999; Aug.: 20(8). 319-323
- 2- EPR analysis of nitrosyl-hemoglobin, an unequivocal marker of nitric oxide release from NO-NSAIDs *in vitro* and *in vivo*.  
*Aldini G., Carini M., Stefani R., Maffei Facino R., Rossoni G. and Del Soldato P.*  
Presented at the 11<sup>th</sup> International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research. Florence, Italy. June 4-8, 2000.
- 3- No-Aspirin inhibits IL-1 $\beta$ -converting Enzyme (ICE) and Prevents IL-1 $\beta$ , IL-18 and IFN $\gamma$  release from Endotoxin-stimulated Human Peripheral Blood Monocytes.  
*Fiorucci S., Santucci L., Del Soldato P., Morelli A.*  
J. Immunol., 2000. In Press.
- 4- Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, NCX 4016, in the stomach of diabetic rats.  
*Tashima K., Fujita A., Umeda M., Takeuchi K.*  
Life Sciences, 2000. Aug. 18; 67(13): 1339-52
- 5- Nitric Oxide: implications for therapeutic breakthroughs.  
*Burgaud, J.L., Del Soldato P.*  
ID Weekly Highlights, Current Drugs Ltd., August 2000
- 6- Myocardial protection by the nitroderivative of aspirin, NCX 4016: *in vitro* and *in vivo* experiments in the rabbit.  
*Rossoni G., Berti M., De Gennaro Colonna V., Bernareggi M., Del Soldato P. and Berti F.*  
Ital. Heart J. 2000. Feb. 1(2): 146-55.
- 7- NO-aspirin protects from T cell-mediated liver injury by inhibiting caspase-dependent processing of Th1-like cytokines.  
*Fiorucci S., Santucci L., Antonelli E., Distrutti E., Del Sero G., Morelli O., Romani L., Federici B., Del Soldato P., Morelli A.*  
Gastroenterology 2000. Feb; 118(2): 404-21
- 8- Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity.  
*al-Swayeh OA., Futter LE., Clifford RH. and Moore P.K.*  
Br. J. Pharmacol. 2000. 130: 1453-1456

Pour étudier les effets pharmacologiques, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de ses produits, NicOx collabore dans le monde entier avec des chercheurs reconnus pour leur compétence qui guident et conseillent la société dans ses programmes de recherche et de développement. Parmi ces nombreux collaborateurs, plus de cent au total, nous pouvons noter les Professeurs Ignarro\* (UCLA Medical College, USA), Samuelson\* (Karolinska Institute, Sweden), Moncada (Wolfson Institute, UK), Flower (William Harvey Research Institute, UK), Hawkey (University Hospital Nottingham, UK), Paoletti (University of Milan, Italy), Emery (University Hospital Leeds, UK), Wallace (University of Calgary, Canada), Benjamin (Queen's College Londres, UK). \* Lauréat du Prix Nobel.

NicOx is a biopharmaceutical company developing innovative new drugs designed to have improved safety and efficacy profiles through the application of the recently discovered properties of nitric oxide (NO). The Company is at the forefront in the research and development of nitric-oxide-releasing therapeutics. The Company is targeting major pharmaceutical markets including pain and inflammation and a broad range of other therapeutic categories, including cardiovascular diseases, respiratory diseases, inflammatory bowel disease, urinary incontinence, osteoporosis, Alzheimer's disease and glaucoma.

Nitric oxide, a compound that usually takes the form of an odorless, colorless gas, is synthesized in the cells of mammals and is believed to be involved in a broad range of biochemical and physiological reactions. Scientific research, including recent groundbreaking studies for which three scientists (including a member of the Company's Scientific Advisory Board) were awarded the 1998 Nobel Prize in Physiology or Medicine, has shown nitric oxide not only to convey biochemical signals that result in a wide spectrum of effects on different biological systems, including the cardiovascular, central nervous and immune systems, but also to act as an important regulator of general cellular processes. These findings indicate the potential for nitric oxide to play a role in the discovery of breakthrough drugs for a wide variety of diseases that may not only have fewer side effects than existing products, but also may be more effective. Using its proprietary technology, the Company seeks to exploit this potential through the development of nitric-oxide-releasing therapeutics.

The Company's innovative approach harnesses the beneficial properties of nitric oxide by grafting a nitric-oxide-releasing structure onto existing drugs. By beginning with a conventional drug whose pharmacological properties are well known, the NicOx benefits from an existing base of knowledge from which to design preclinical and clinical development studies. This enables evidence of efficacy and reduced side effects to be confirmed very early in clinical development, and in some cases by the end of Phase I, thereby shortening the overall product development cycle. In preclinical tests, the Company's drug candidates have shown dramatically reduced side effect profiles compared with the parent drugs, and in many cases show the potential to be more effective. Furthermore, the Company has already achieved proof of principle in humans for one of its lead nitric-oxide-releasing compounds. At present, three drug candidates have advanced to human clinical trials.

The Company is focusing on the development of nitric-oxide-releasing derivatives of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as flurbiprofen. More than 30 million people worldwide consume NSAIDs every day. The major drawback of NSAIDs and aspirin is their tendency to cause gastrointestinal damage. Gastrointestinal toxicity from NSAIDs is estimated to be the most frequent drug side effect in the United States, and almost 25% of the anti-ulcer drug market has been estimated to be aimed at treating this side effect. The recently introduced COX2 selective NSAIDs have gained significant market share, but concerns remaining regarding the theoretical side-effects of the selective inhibition including renal toxicity, edema, hypertension and thrombosis. Preclinical research by the Company has shown that grafting a nitric-oxide-releasing structure onto aspirin and a range of NSAIDs may greatly reduce their gastrointestinal, renal and cardiovascular adverse effects and increase their safety in frequent use conditions and situations of pre-existing gastrointestinal damage. The Company's preclinical research also suggests that the anti-thrombotic properties of nitric oxide may significantly enhance the effectiveness of aspirin in the prevention of cardiovascular disease. Furthermore, the Company's nitric oxide releasing NSAIDs may be suitable for new indications including incontinence, osteoporosis, Alzheimer's disease and prevention of colon cancer.

The Company is developing NCX 4016 (NO-aspirin) for the treatment of cardiovascular disease and pain and inflammation. Its IND (Investigational New Drug) application was approved by the FDA (Food and Drug Administration), allowing for future clinical trials of the compound in the United States.

The most advanced of these drug candidates is HCT 1026 (NO-flurbiprofen), currently in phase II clinical development for urinary incontinence and Paget's disease, a disease that can lead to osteoporosis. In parallel, the Company is developing a broad range of uses for other nitric-oxide-releasing NSAIDs as new treatments in important pharmaceutical growth markets, including asthma, inflammatory bowel disease, urinary incontinence, osteoporosis, Alzheimer's disease and glaucoma. The Company plans to advance clinical development of these drug candidates on its own, with a view to negotiating further strategic partnerships based on such drugs at later stages in the development process.



**- QUALIBIO -**

Other important drug candidates in the Company's pipeline include nitric-oxide-releasing drugs to treat a range of indications, including nitric oxide releasing steroid derivatives for the treatment of inflammatory bowel disease and respiratory diseases such as asthma. The Company has also recently advanced into the development of the lead compounds NCX 2216 from a new series of nitric oxide releasing anti-inflammatory compounds with potent anti-oxidant properties for the treatment of Alzheimer's disease. For the treatment of asthma, the Company is developing NCX 950, a nitric oxide releasing beta agonist. NCX 904, a nitric oxide releasing beta antagonist is in development for the treatment of glaucoma. In addition to the drug candidates already in its development pipeline, the Company believes its nitric-oxide-releasing technology has potential applications in far-ranging fields that the Company has identified for future study.

**Atelier 2**

**Monsieur Jacques POULET**  
**Union des industries de la fertilisation**

**Fertilisation et environnement : Union des Industries  
des fertilisants et Amendements**

## **Atelier n° 2 : Fertilisation et environnement. (Unifa).**

Aujourd'hui, l'agriculteur est confronté à plusieurs défis. Le plus ancien, partagé par tous, et sûrement le plus important est de pouvoir vivre de son métier. Les politiques agricoles communes successives ont en général répondu à cette préoccupation. Par contre, la dernière « PAC », Agenda 2000, change complètement la donne. Il est prévu une baisse du revenu de l'agriculteur d'environ 15% sur les cinq ou six prochaines années. L'agriculteur doit donc repenser son métier en terme de compétitivité.

Le second challenge de l'agriculteur consiste à fournir des produits de qualité à des prix concurrentiels. Ce principe, qui semble être une exigence nouvelle des consommateurs, est en fait le moteur d'une agriculture de progrès qui a probablement conduit à certains des excès que nous connaissons aujourd'hui. La forte médiatisation des événements qui touchent actuellement l'agriculture (OGM, ESB, etc) a annihilé, chez le citoyen, tout jugement critique et rationnel au profit de réactions épidermiques et émotives. L'agriculteur doit communiquer pour faire connaître son métier.

Enfin, le dernier défi est peut-être né des succès que l'agriculteur a remportés sur les deux précédents. Auparavant « nourrisseur » de ces concitoyens, l'agriculteur devient « pollueur » de notre environnement. Etonnant pour une profession proche de la nature dont le crédo est de transmettre à la génération suivante un patrimoine (le sol, la ressource en eau, le cheptel, etc.) intact sinon amélioré. Désormais l'agriculteur doit prendre en compte l'impact de ses activités sur l'environnement.

La vie de l'industrie des fertilisants est très liée à cette évolution. Hier associée à la réussite de l'agriculture pour nourrir la planète et aux gains de compétitivité de notre secteur agricole, l'industrie des fertilisants se retrouve aujourd'hui au premier rang des accusés à travers l'utilisation des fertilisants minéraux. Les discours extrémistes de certains occultent totalement l'importance vitale pour notre agriculture d'une fertilisation minérale qui malgré toutes les hypothèses restera nécessaire. Les industriels, en relation avec les instituts techniques, ont donc mis en place des expérimentations et développé des outils de gestion de la fertilisation minérale. L'objectif est triple : optimiser l'utilisation de la fertilisation minérale, limiter les risques pour l'environnement et garder, voire améliorer la qualité de la production.

Cet atelier vous propose trois présentations succinctes, ayant pour thème principal l'azote, pour illustrer ces propos :

### **1. L'industrie des fertilisants, le cycle de l'azote, le bilan azoté.**

Une agriculture durable va de paire avec l'utilisation des fertilisants minéraux azotés. Quel tonnage représentent ces fertilisants azotés ? Comment fabrique-t-on un fertilisant azoté ? Quelles sont les autres sources d'azote disponibles pour la plante ? Voici quelques-uns des points qui seront présentés avant d'avoir un aperçu rapide du cycle de l'azote en agriculture et du « bilan azoté » pour mieux comprendre toute la difficulté que représente la gestion de la fertilisation azotée. L'utilisation de plus en plus courante du « bilan azoté » accompagnée d'outils d'aide à la décision permet d'ajuster au mieux la fertilisation minérale aux besoins de la plante. Si malgré toutes les précautions prises, un accident climatique, phytosanitaire, etc, aboutissait à un reliquat d'azote élevé dans le sol, il existe des méthodes pour piéger ces nitrates et limiter le risque de transfert vers les nappes phréatiques.

### **2. Les outils de gestion de la fertilisation azotée : un exemple, le chlorophylomètre.**

Pour minimiser le stock de nitrates dans le sol après la récolte, il faut raisonner sa fertilisation azotée. Cela consiste à alimenter sans excès la culture durant son cycle de végétation sans pour cela avoir une incidence négative sur son potentiel de rendement. L'objectif des outils de pilotage de la fertilisation azotée est de réduire le plus possible le reliquat azoté provenant des fertilisants minéraux. Ces outils mesurent la teneur en azote de la plante. L'outil présenté par Hydro Agri France est un chlorophylomètre (Hydro-N tester) capable d'aider l'agriculteur dans sa prise de décision en fonction du rendement optimal à atteindre mais aussi en fonction d'objectif de qualité du produit à récolter.

**3. Un exemple de mesure pour limiter l'impact de la fertilisation azotée sur l'environnement : le bassin versant d'Aradé.**

Depuis 1980, dans la région de Toulouse, un dispositif expérimental à grande échelle a été mis en place par Grande Paroisse, premier fabricant de fertilisants en France, en association étroite avec les agriculteurs: le bassin versant d'Aradé. Cette expérimentation a mis en évidence une relation de cause à effet entre pratiques des agriculteurs, pluviométrie et concentration en nitrates des eaux, et un lien entre structure géographique du terrain et dynamique de l'azote. Des mesures ont été retenues et appliquées sur l'ensemble du dispositif : des mesures préventives concernent la gestion des cultures et une conduite raisonnée de la fertilisation azotée et des mesures curatives consistent à aménager le paysage agricole pour réduire le risque de transfert de nitrates vers les eaux de surface.

## **MODULE 2 bis**

<b>NITRATES CYCLE BIOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENT</b>
---

**Présidents de séance :**

**Monsieur FAVIER :**

*Ecole Supérieure Physique Chimie Industrielle - PARIS*

**Professeur Maria Elvira LOPEZ-MOSQUERA :**

*Ecole Polytechnique Supérieure Université de  
St Jacques de Compostelle - LUGO*

- QUALIBIO -

**Professeur Jean-Claude REMY**

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie – ENSAM – Montpellier

**Le cycle biogéochimique de l'azote**

- Assises ENVIROBIO 2000 -  
"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

L'azote est largement présent dans tous les compartiments de la planète et notamment dans la biosphère continentale dans laquelle il est stocké dans la matière organique des sols. L'azote est présent naturellement tant à l'état solide dans les matières organiques vivantes et mortes que sous la forme liquide en solution, qu' à l'état gazeux dans l'atmosphère.

En l'absence de tout apport par l'homme, l'azote contenu dans la biosphère est issu majoritairement de la fixation biologique par les fixateurs libres ou symbiotiques. Les pertes concernent alors essentiellement la lixiviation des nitrates mais aussi surtout les pertes gazeuses sans lesquelles l'azote se serait accumulé à la surface du sol, dans la matière organique.

Afin de stimuler la production primaire des plantes non symbiotiques l'homme a cherché à accroître la quantité d'azote minéral mis en jeu dans les cycles culturaux soit par des apports organiques en utilisant la capacité de minéralisation du sol, soit en apportant directement la forme utilisable par les végétaux, c'est à dire le nitrate. Les quantités mises en jeu sont ainsi passées globalement de 100 kg à 300 kg. Une telle démarche s'accompagne forcément d'une plus grande difficulté de gestion avec un accroissement du risque de se retrouver en situation d'excès quelle que soit la forme d'azote minérale ou organique apportée.

L'azote minéral ou organique est présent naturellement dans les sols et les eaux depuis toujours. Seul l'excès est redouté et bien entendu la définition et l'acceptation de seuils font l'objet d'âpres débats. Le principe de précaution, appliqué à la teneur en nitrate de l'eau potable, a conduit à l'adoption du seuil de 50 mg de NO<sub>3</sub>/l, compromis entre les risques toxicologiques encourus par les consommateurs et la faisabilité d'une gestion durable et viable des agrosystèmes par les agriculteurs.

Les dispositifs réglementaires étant fixés, c'est à l'agronome de trouver les solutions techniques capables de produire en quantité et en qualité tout en préservant les ressources naturelles, notamment la qualité de l'eau.

Nitrogen is globally present in all the planet compartments. Continental biosphere contains the major part of nitrogen in the soil organic matter. Nitrogen is present at solid state in living and dead organic matter, at liquid state in soil, rivers and lakes solution as well as at gaseous state in the atmosphere.

If man does not add nitrogen artificially, the content of the biosphere is mainly coming from free or symbiotic biological fixation. Lost of nitrogen is the fact of two processes. The first is leaching toward ground water and sea. The second is denitrification to the atmosphere, phenomenon without which nitrogen should be accumulated in soil organic matter at the soil surface.

According to the objective to increase primary production, man has attempt to increase the quantity of mineral nitrogen in soil, by the way of organic manure in the first time and directly by nitrate supply in the second time. The annual budget of mineral nitrogen is now near 300 kg of nitrogen instead of about 100 kg initially. This change induce naturally larger difficulties to manage nitrogen securely without lost.

Mineral nitrogen is naturally present in the biosphere. It is not a xenobiotic element. However, only the excess is damaging. The threshold of 50 mg NO<sub>3</sub> per litre is a reasonable compromise between health risks and an acceptable constraint in a productive and sustainable agrosystem management.

Regulations in this matter are now adopted. The agronomist must found the technical solutions for promoting new agricultural systems economically efficient, safe for the health and respectful of the environment.



**Docteur Max THIBAULT**

Association pour la promotion, l'étude et la protection  
des écosystèmes aquatiques – FOUGERE

**Eco-histoire : évolution de la qualité des eaux :  
exemple des rivières à saumon en Bretagne depuis  
l'ancien régime**

En utilisant le Saumon atlantique comme indicateur des relations entre les activités humaines et l'écosystème fluvial, un bilan de l'évolution de la qualité de l'eau des cours d'eau bretons à saumon est dressé dans une perspective historique sur une durée de près de six siècles, du XV<sup>ème</sup> à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. Ce travail a eu pour but de tester un des aspects de l'hypothèse d'une abondance passée extraordinaire du saumon dans cette province sous l'Ancien Régime, admise sans hésitation depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle.

Il s'agit essentiellement d'un travail bibliographique, de culture scientifique, employant quelques résultats du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle concernant les pollutions d'activités anciennes, rouissage du lin et du chanvre, tanneries. Deux autres activités sont aussi prises en compte, les moulins à papier et les mines de plomb argentifère. Cette étude repose sur une méthode en quatre points incluant la dimension historique :

- \* les connaissances actuelles de l'écologie de l'espèce et de sa répartition en Bretagne, passée (au début du XVIII<sup>ème</sup> siècle) et présente, localisent l'étude quasi-exclusivement à la moitié occidentale de la péninsule armoricaine. Les fleuves côtiers de la moitié orientale, à l'exception du Couesnon, n'ayant pas été colonisés par le saumon.

- \* une approche transdisciplinaire, avec mise en concordance, dans le temps et dans l'espace, sur les bassins versants de ces cours d'eau, des travaux d'historiens, avec des documents bruts de l'époque, en y intégrant les mesures réglementaires.

- \* un retour systématique aux sources originales. Ce dernier point constitue le socle de cette étude. Il s'appuie sur les dépouillements des documents d'archives, d'ouvrages, de rapports officiels, d'articles.

C'est surtout la pollution provenant de la pratique du rouissage dans les cours d'eau et des effluents des mines de plomb argentifère qui est connue. Les pollutions issues des effluents des tanneries et des moulins à papier sont, aussi, comme le rouissage, des pollutions organiques et physiques, mais plus localisées. Ces quatre activités étudiées concernant l'ensemble des cours d'eau à saumon, sauf pour les tanneries qui ne se rapportent qu'au Finistère.

- \* elles se répartissent préférentiellement dans un large quart nord-ouest de la Bretagne et à l'est.

- \* elles montrent un accroissement depuis le XV<sup>ème</sup> siècle, pour atteindre un apogée du milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, et décliner ensuite, puis disparaître, à quelques décennies près, au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle.

L'hypothèse est émise d'une pollution croissante entre le XV<sup>ème</sup> siècle et le milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle, d'un apogée de cette pollution jusqu'au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, en relation avec l'évolution économique de ces activités. La Bretagne a compté parmi les plus grandes provinces toilières de France et a même figuré à leur tête à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle ; les mines de plomb argentifère sont une des plus importantes du royaume au cours de la seconde moitié du XVIII<sup>ème</sup> siècle. L'importance de la pollution est connue des contemporains : la couleur jaune de l'eau des rivières suite au rouissage, la mortalité des poissons et des hommes (dysenterie, saturnisme, pouvant expliquer la surmortalité bretonne observée à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle), et la destruction de la végétation (les arbres morts à 15 m sur chaque rive en aval de l'effluent des mines de Basse-Bretagne).

Les mesures réglementaires ne concernent que le rouissage dans les cours d'eau. Elles existent depuis les coutumes (jusqu'au décret de 1958) et n'ont jamais été réellement appliquées. Le prix de vente plus élevé des toiles provenant du rouissage en eau courante, de meilleure qualité, a toujours constitué un élément prépondérant par rapport à la qualité de eau.

Une conclusion en trois points se dégage :

- \* Force est de constater que ce n'est pas la réglementation qui a entraîné, sinon l'arrêt, tout au moins une diminution de la pollution due au rouissage, mais l'arrêt de cette activité qui a conduit à l'absence de réglementation.

- \* L'abondance passée extraordinaire du saumon en Bretagne sous l'Ancien Régime est un mythe. Ceci s'appuie sur une quasi-stabilité des zones de production depuis le début du XVIII<sup>ème</sup> siècle et sur les pollutions croissantes mises en évidence principalement sur les fleuves côtiers bretons du quart nord-ouest et à l'est de la province.

- \* La césure du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle consacre la fin d'activités anciennes et le développement de quatre éléments, la croissance urbaine, la généralisation de l'adduction d'eau, l'intensification de l'agriculture, l'évolution des soucis d'hygiène de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle vers les soucis de santé qui émergent à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle.

The Atlantic Salmon is used as an indicator of the links between human activities and the river ecosystem. This permits to sum up through nearly six centuries, from the 15<sup>th</sup> to the end of the 20<sup>th</sup> century, the evolution of the water quality of the Briton salmon rivers. This article aims at testing one of the aspects of the hypothesis concerning an extraordinary abundance of salmon in this area in the Ancien Régime, hypothesis that has been admitted, without check, since the beginning of the 20<sup>th</sup> century.

Work is based on several scientific writings, and uses a few results of the middle 20<sup>th</sup> century concerning pollution from ancient activities, retting of flax and hemp, tanning. Two other activities are also taken into account, production in paper water mills and argentiferous lead mines. This study lies on a four-point method that includes an historical dimension:

- What is known about the ecology of the species and its repartition in Brittany, passed (beginning of the 18<sup>th</sup> century) and present focuses the study quite exclusively on the Western part of Brittany. Coastal rivers of the Eastern part \_ except for the Couesnon river\_ have not been colonised by the Salmon.
- An approach through different fields, linking both in space and time works of Historians on the water sheds of these streams with original documents, including statutory measures of that time.
- A systematic check back to the sources of data. That point represents the cornerstone of this study. It backs on reading recorded documents, books, official reports, and articles.

Pollution from retting in rivers and from producing argentiferous lead is well known. However, pollution from tanning and the one that derives from paper water mills is also an organic and physical pollution, but more localised. These four activities concern all of the Salmon streams, except for tanneries that were only found in the Finistère area.

- These four activities are mainly found in a large NorthWestern part and in the Eastern part of Brittany.
- They grew from the 15<sup>th</sup> century up to the middle 18<sup>th</sup>-middle 19<sup>th</sup> centuries, and then fell to disappear in the middle of the 20<sup>th</sup> century.

One hypothesis is that pollution grew between the 15<sup>th</sup> century and the mid 18<sup>th</sup> century. Pollution reached a peak until the mid 19<sup>th</sup> century because of the economic evolution of these activities. Brittany used to be one of the biggest areas that produced canvas in France and was even heading at the end of the 18<sup>th</sup> century. Brittany's argentiferous lead mines are among the biggest ones of the whole kingdom in the second half of the 18<sup>th</sup> century. The importance of pollution was well known at that time. Proves were the yellow colour given to the river water by retting, fish and people mortality (because of dysentery, saturnism, that could explain the high mortality in Brittany at the end of the 18<sup>th</sup> century), and the destruction of vegetation (e.g. dead trees were found up to 15 m from both banks downstream of the sewage of Basse-Bretagne mines).

Statutory measures only concern retting in streams. They had been existing since the French coutumes (local rules from the Middle Age until the 1958 decret) and have never really been applied. The higher sale price of canvas retted in running water, thus giving a better quality, has always been determining in the quality of water.

A three-point conclusion arises:

- Regulation did not entail the stop or at least less pollution from retting, but the death of this activity did entail a situation of no regulation.
- The presumed passed abundance of salmon in Brittany in the Ancien Régime is a myth, based on a quasi-stability of the production areas since the beginning of the 18<sup>th</sup> century and on the growing pollution observed mainly on the coastal rivers in the North West and on the East of Brittany.
- The mid 20<sup>th</sup> century represents a break with the end of ancient activities and the development of four elements, i.e. urban growth, a generalised water adduction, an intensified agriculture, the evolution of hygienic cares at the end of the 19<sup>th</sup> century and a growing interest in health considerations at the end of the 20<sup>th</sup> century.

**Professeur Sybil SEITZINGER**

Institute of Marine and Coastal Sciences – Rutgers University  
New Brunswick – New Jersey – USA

**Madame Carolien KROEZE**

Environmentale Systems Analysis Group  
Wageningen University – NETHERLAND

**Transport de Nitrates par les rivières vers les  
écosystèmes côtiers**

Human activities have markedly increased nitrogen (N) inputs to terrestrial ecosystems. A portion of this nitrogen enters rivers and downstream coastal ecosystems resulting in coastal eutrophication and increased greenhouse gas production. The magnitude and spatial variability in N inputs to coastal ecosystems globally is related to the spatial distribution of human population, agriculture, and fossil fuel combustion, based on the N-Model. Coastal ecosystems in the Northern Hemisphere receive approximately 90% of the global dissolved inorganic N (DIN = nitrate+ammonia) transported by rivers (~21 Tg N/y). About 45% of global DIN export is from watersheds in India, China and Southeast Asia. European rivers draining into the Northeastern Atlantic and European Seas (Baltic, Mediterranean, Black) carry approximately 20% of DIN exported by rivers globally, although they account for only 10% of the global exoreic area. Synthetic N fertilizer use and NO<sub>y</sub> atmospheric deposition in these European watersheds is ~20-25% of global use/deposition; human sewage is ~12% of the global total. The Mediterranean region has the lowest areal based N inputs to watersheds (1005 kg N/km<sup>2</sup>) from these three sources, while the North Atlantic region has the highest (4300 kg N/km<sup>2</sup>), with intermediate rates in the Black Sea (2800 kg N/ km<sup>2</sup>) and Baltic region (1800 kg N/ km<sup>2</sup>). As a result, DIN export by rivers from the North Atlantic region (990 kg N/ km<sup>2</sup>) is almost three times the export from the Black or Baltic region, and almost eight times greater than from the Mediterranean region. In the coming decades, substantial increases in N export are predicted in many world regions due to continued increases in food production and consumption, and industrialization. By the year 2050, DIN inputs are estimated to more than double globally, with largest absolute increases predicted for Asia, and large relative increases in Africa and South America.

Not all nitrogen forms contribute equally to coastal eutrophication. Dissolved inorganic N often accounts for only half of the N entering coastal ecosystems; organic N, in both particulate and dissolved forms, comprises the remainder. Only a portion of this organic nitrogen is biologically available on the time scales relevant to many coastal ecosystems.

A portion of the nitrogen entering rivers and coastal ecosystems is permanently removed by denitrification. Based on the RivR-N model, approximately 40% to 75% of the N input to 16 rivers in the eastern U.S. is removed within the river during transport. A further ~20% to 70% of the N input to estuaries is removed by denitrification. Water residence time is an important factor controlling the proportion of N removed in both rivers and estuaries.

An additional impact of the increased input of anthropogenic N is increased production of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), a green house gas that is involved in stratospheric ozone destruction. Nitrous oxide emissions from rivers and coastal marine ecosystems associated with anthropogenic N inputs are estimated to account for approx. 25% of total global anthropogenic N<sub>2</sub>O emissions; by the year 2050 these aquatic emissions are predicted to more than triple. An open dialog among scientists, policymakers and nitrogen producers and users is needed to optimize nitrogen management in food and energy production and environmental protection in the coming decades.

## **Les transferts des nitrates par les rivières aux écosystèmes côtiers : effets de l'occupation des sols et des transformations dans les rivières.**

Sybil P. Seitzinger, Rutgers University, Institute of Marine and Coastal Sciences, New Brunswick, NJ, USA.

Carolien Kroeze, Environmental Systems Analysis Group, Department of Environmental Sciences, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands

Les activités humaines ont sérieusement augmenté les apports d'azote aux écosystèmes terrestres. Une part de cet azote rejoint les rivières et l'aval des écosystèmes côtiers, ce qui entraîne une eutrophisation des côtes et une production accrue de gaz à effet de serre.

L'importance et la variabilité spatiale des apports d'azote aux écosystèmes côtiers sont liées aux distributions spatiales de population humaine, d'agriculture, de combustion de carburant fossile, à partir du modèle de l'azote. Les écosystèmes de l'hémisphère Nord reçoivent environ 90 % de l'azote minéral dissout (DIN = Nitrate + ammoniacale) transporté par les rivières (environ 21 t N/an). Environ 45 % de ces DIN exportés proviennent des bassins indiens, chinois et d'Asie du Sud.

Les rivières européennes se rejetant dans le Nord Est de l'Océan Atlantique et dans les mers européennes (mer baltique, méditerranéenne et noire) charrient environ 20 % des DIN rejetés par les rivières, bien qu'elles rentrent en ligne de compte pour seulement 10 % des terres émergées. L'usage de fertilisant minéral et les dépôts atmosphériques (NO<sub>y</sub>) dans ces bassins européens est de l'ordre de 20-25 % de l'usage et des dépôts atmosphériques totaux.

Les rejets humains représentent environ 12 % du bilan total. Les régions méditerranéennes connaissent le taux le plus bas d'intrant azoté, soit 1 005 kg N/km<sup>2</sup> de bassin à partir de ces trois origines, tandis que la région Nord Atlantique connaît le niveau le plus élevé (4 300 kg N/km<sup>2</sup>), alors que le niveau intermédiaire est dans la mer Noire (2 800 kg N/km<sup>2</sup>) et la région baltique (18 kg N/ha). Ainsi, DIN reçues par les rivières du Nord Atlantique sont trois fois plus élevées que celles des régions baltiques ou de la mer Noire et 8 fois plus fortes que les régions méditerranéennes.

Dans les décades à venir, des augmentations substantielles dues à l'augmentation continue des productions agricoles, de la consommation et de l'industrialisation. A l'horizon 2050, les estimations donnent un doublement des intrants de DIN, avec la plus grande évolution prévue pour l'Asie, mais également de relativement grande augmentations pour l'Afrique et l'Amérique du Sud.

Toutes les formes de l'azote ne contribuent pas de façon analogue à l'eutrophisation. L'azote minéral ne représente généralement que seulement la moitié de l'azote en jeu dans les écosystèmes côtiers ; l'azote organique, tant sous forme particulaire que dissoute, représente le complément. Seule une part de cet azote organique est biologiquement disponible à l'échelle de temps appropriée aux écosystèmes côtiers.

Une fraction de l'azote rejeté dans les rivières et dans les écosystèmes côtiers est constamment perdu par dénitrification. Sur la Base du modèle RivR-N, près de 40% à 75% du N rejeté dans 16 rivières de l'Est des Etats Unis, est perdu par la rivière, durant le transfert. La dénitrification dans les estuaires contribuerait à éliminer 20% à 70% de l'azote qu'ils reçoivent. Le temps de résidence de l'eau est un facteur déterminant dans le contrôle de l'azote éliminé, tant dans les rivières que dans les estuaires.

Un impact complémentaire de l'augmentation de l'azote d'origine humaine porte sur l'augmentation de l'émission d'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O), un gaz à effet de serre qui est impliqué dans la destruction de l'ozone stratosphérique. Les émissions de ce gaz provenant des rivières et des écosystèmes marins côtiers, associées aux apports d'azote liés aux activités humaines sont estimés représenter environ 25% des émissions totales de N<sub>2</sub>O ; à l'horizon 2050, ces émissions aquatiques devraient tripler. Un dialogue ouvert regroupant les scientifiques, les producteurs et les utilisateurs d'azote et les instances chargées de la politique réglementaire est nécessaire pour améliorer la gestion de l'azote dans les productions agricoles et énergétiques, et dans la protection de l'environnement pour les décennies à venir.

- QUALIBIO -

**Monsieur J-P FAILLAT**

Laboratoire d'hydrogéologie, ISAMOR-UBO

Technopôle Brest-Iroise – PLOUZANE

**Dénitrification biologique naturelle dans les  
eaux souterraines : modes d'occurrence et  
conséquences pratiques**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

La dénitrification biologique naturelle dans les eaux souterraines : modes d'occurrence et conséquences pratiques.

Les problèmes d'ordre à la fois quantitatif et qualitatif posés par l'utilisation des eaux en Bretagne constituent d'ores et déjà un facteur limitant dans l'utilisation des ressources en eau de cette région et son essor économique. En particulier, les concentrations excessives en nitrates entraînent l'abandon de nombreux captages. Cependant, des forages d'exploitation profonds, pouvant dépasser la centaine de mètres, donnent des eaux dépourvues de nitrates, dans un environnement où cet ion est abondant dans les captages par puits, par sources aménagées, voire dans certains forages tout aussi profonds. Une explication à cette apparente incohérence a été recherchée par des études détaillées, dans le périmètre expérimental de Kerveldréac'h (PEK) en Finistère, de 0,35 km<sup>2</sup>, sur schiste, et dans celui de Maupertuis (PEM) en Côte d'Armor, de 0,17 km<sup>2</sup>, sur granite. Ces études font ressortir la forte influence des conditions redox et hydrodynamiques dans l'élimination des nitrates par dénitrification biologique naturelle en profondeur, au delà de 30-40 m dans les schistes, et à peine un peu plus bas dans les granites, ce qui aboutit à une zonation hydrochimique verticale des nappes de fissures. Cette zonation peut être masquée par le fonctionnement interne des forages, phénomène dont la non prise en compte dans l'évaluation de la représentativité des échantillons peut biaiser considérablement les interprétations. Afin de vérifier l'hypothèse d'une dénitrification biologique profonde, les microflore bactériennes dénitrifiantes hétérotrophes et autotrophes (*Thiobacillus denitrificans*) ont été quantifiées. Le phénomène de dénitrification, qui a donc un rôle central, est connu dans les sols depuis longtemps et a été souvent étudié depuis le début des années soixante dix dans les nappes d'interstices ou de fissures et chenaux des aquifères de bassins sédimentaires, ce qui a donné lieu à des synthèses. Il a été bien moins abordé en milieu uniquement fissuré de socles éruptifs et métamorphiques, à relativement faible perméabilité dans l'ensemble, ce qui est le cas du Massif Armoricain. Les deux grands types de roches, schistes et granites, qui représentent l'essentiel des aquifères de cette région ayant montré la même disposition, il est licite d'envisager que cela soit la règle. Par conséquent, on peut envisager de trouver à peu près partout des eaux relativement profondes sans nitrates, mais contenant fréquemment du fer et du manganèse. Il n'en reste pas moins que la partie supérieure des nappes de fissures, nitratée, participe largement aux écoulements de surface, ce qui rend indispensable le contrôle des apports en nitrates et introduit des retards entre les actions de remédiation et les effets escomptés (quelques années).



A study of the organisation and functioning of a hydrogeological system in a fractured aquifer in crystalline rocks was undertaken in the Kerharo river basin in Brittany (Finistère, France). Observations and measurements were made from the scale of the river basin to that of a 0.35 km<sup>2</sup> experimental perimeter with more than 50 water sampling points. A several method approach revealed some aspects of the geometry of the aquifer (heterogeneity, anisotropy, connectivity, partitioning) and provided information about the hydrodynamic situation and especially the hydrochemical functioning of the aquifer. Redox and hydrodynamic conditions control vertical stratification through the position of the oxido-reduction zone between a thin oxidizing zone containing nitrate and a nitrate-free reducing zone. The bacteriological approach suggest that the site potential in terms of denitrifying processes would be apparently associated to the heterotrophic part of the bacterial communities. The autotroph fraction (*Thiobacillus denitrificans*) is found at lower densities and is merely linked to surfaces. However, the occurrence of these two types of microflora in all of the six studied systems confirm that denitrifying processes can develop provided environmental conditions allow. The possibility of extension of this scheme to others aquifers is examined.

*Key words* : Fractured medium, nitrate, denitrification, denitrifying bacteria, hydrogeochemical zoning, Finistère, Brittany.

- QUALIBIO -

**Monsieur Pierre CASTILLON et Monsieur Gilles THEVENET**

ITCF – Institut Technique des Céréales et des Fourrages – PARIS

**Rôle des systèmes de cultures dans le transfert  
de nitrate vers les aquifères récepteurs**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

Dans tous les écosystèmes, la dynamique de l'azote conduit à la présence de nitrate dans les sols. Qu'il provienne des engrais minéraux ou de la minéralisation de l'azote organique, une partie peut être transférée vers les eaux de surface ou souterraines qui approvisionnent les captages d'eau potable.

Faibles en général dans les écosystèmes naturels (forêts, pelouses de montagne ... etc) les transferts de nitrate, du sol vers les aquifères récepteurs, sont parfois importants dans les sols cultivés et d'autant plus que l'agriculture est intensive. Celle-ci utilise souvent des quantités importantes de fertilisants azotés qui se sont ainsi vu imputer la responsabilité principale de l'accroissement des teneurs en nitrate des eaux. Le mot engrais est alors devenu synonyme de pollution. Or l'azote minéral présent dans le sol à la récolte des cultures, et donc susceptible d'être entraîné par les eaux de drainage ou de ruissellement, ne contient qu'une très faible part des engrais minéraux apportés, sauf lorsque la fertilisation est excessive par rapport aux stricts besoins des cultures. Néanmoins la réglementation qui s'applique aux zones vulnérables depuis la mise en œuvre de la directive nitrate concerne principalement les pratiques de fertilisation azotée des cultures.

Les fuites de nitrate des parcelles agricoles sont en réalité beaucoup plus le fait des systèmes de cultures pratiqués que de leur fertilisation azotée. La nature des espèces cultivées et leur mode de succession dans les rotations culturales déterminent l'époque et la durée des intercultures au cours desquelles l'ion nitrate présent, ou produit dans le sol par la minéralisation des matières organiques, est susceptible d'être drainé. Dans un contexte pédoclimatique donné, la quantité de nitrate transférée vers les aquifères est d'autant plus élevée qu'est longue la durée de la saison pluvieuse pendant laquelle le sol est dépourvu de couvert apte à y puiser de l'azote.

Toutefois indépendamment de l'époque et de la durée du cycle végétatif de la culture, la quantité d'azote nitrique perdue par un sol cultivé, c'est à dire non récupérable par les cultures ultérieures, peut aussi varier selon l'espèce cultivée en relation avec certaines de ses caractéristiques : profondeur d'enracinement, aptitude à puiser l'eau dans le sol, teneur en azote des résidus de culture ... etc. C'est ainsi que les pertes d'azote sont en général beaucoup plus élevées après un maïs qu'après un sorgho dont les cycles végétatifs sont pourtant concomitants. Il en est de même pour les cultures de pois et d'orge de printemps, les fuites d'azote nitrique étant généralement plus importantes après la culture de pois qui ne reçoit jamais de fertilisation azotée.

L'occupation permanente du sol par un couvert végétal constitue la solution idéale pour limiter au minimum les pertes d'azote des systèmes cultivés. La prairie qui en est l'exemple type n'exclut pourtant pas le drainage du nitrate, en quantités parfois importantes. Ceci est particulièrement vrai pour la prairie pâturée dont une part de l'azote que les animaux y restituent au cours du pâturage est inévitablement drainé. L'importance des pertes d'azote dépend beaucoup dans ce cas du mode de gestion de la prairie et tout particulièrement de la part respective de la fauche et de la pâture, ainsi que du chargement d'animaux au pâturage permis par la croissance de l'herbe. Dans les prairies de graminées, la suppression de la fertilisation azotée substituée par l'introduction d'une légumineuse ne modifie en rien le phénomène.

Quelle que soit la nature de l'écosystème, le transfert de nitrate vers les aquifères récepteurs est donc inéluctable. Il a pour origine principale la matière organique du sol dont la minéralisation produit d'autant plus de nitrate que le stock d'azote organique dans le sol est important. Dans les écosystèmes cultivés, la substitution à la fertilisation azotée de solutions apparemment plus "écologiques", telles que l'introduction des légumineuses dans le système de culture, ne modifie pas toujours dans le sens souhaité le phénomène.

In all ecosystems, nitrogen transformations lead to the presence of nitrate in soils. Whether it originates from mineral fertiliser or from the mineralisation of organic nitrogen, part of it may be transferred into surface or underground waters which supply drinking water catchments.

Although generally low in natural ecosystems (forests, moors, mountain pastures etc.) nitrate transfers from the soil into aquifers are sometimes considerable in cultivated soils and especially when farming is more intensive. In this case large amounts of nitrogen fertilisers are used and these are therefore blamed for most of the increase in the nitrate content of the water. The word fertiliser has thus become synonymous with pollution. Yet the mineral nitrogen present in the soil when the crop is harvested, and thus likely to be transported in drainage water or runoff only contains a very small proportion of the mineral fertiliser applied, except when the fertilisation is excessive compared with the strict requirements of the crops. Nevertheless the regulations which have applied to the vulnerable zones since the introduction of the Nitrate Directive in 1991 are mostly concerned with the practice of nitrogen fertilisation of crops.

The losses of nitrate from agricultural fields are in reality more the result of the cropping systems practised than of their nitrogen fertilisation. The nature of the crops grown and their succession in the crop rotation determine the timing and duration of the periods between crops during which the nitrate ion present, or produced in the soil by the mineralisation of organic matter, is likely to be leached. In a given soil/weather situation, the amount of nitrate transferred into aquifers increases when the period between harvest and the sowing of the following crop is longer, especially in winter.

However, quite apart from the timing and duration of the growing period of the crop, the amount of nitrate nitrogen lost from a cultivated soil, i.e. not retrievable by subsequent crops, can also vary according to the characteristics of the species grown, such as rooting depth, ability to extract water from the soil, nitrogen content of the crop residues, etc. Thus nitrogen losses after maize are generally much higher than after sorghum, although their growing seasons are concomitant. It is the same for spring-sown peas and barley, the nitrate nitrogen losses usually being more after the pea crop even though it never receives any nitrogen fertiliser.

The permanent occupation of the land by vegetation, growing as much as weather conditions allow, constitutes the ideal solution to restrict to a minimum the nitrogen losses from cropping systems. Grassland, which is a typical example, may nevertheless allow leaching of nitrate, sometimes in considerable quantities. This is particularly true for grazed pastures for which part of the nitrogen which the animals return to the soil while grazing is unavoidably leached. The magnitude of the losses depends greatly in this case on how the pasture is managed, and particularly on the balance between cutting and grazing. They also depend on the intensity of nitrogen fertilisation which, by increasing grass growth, increases the stocking density of the grazing animals. To introduce legumes into pastures as a substitute for nitrogen fertilisation has no effect on the phenomenon.

Whatever the nature of the ecosystem, the transfer of nitrate into the aquifer is inescapable. It mainly originates from the soil organic matter whose mineralisation produces more nitrate when the amount of organic nitrogen in the soil is greater. In cultivated ecosystems, replacing nitrogen fertiliser by solutions considered more "ecological" such as the introduction of legumes into the cropping system, does not always change the phenomenon in the way it is hoped.

- QUALIBIO -

**Professeur Thomas ADDISCOTT et Professeur David POWLSON**

**IACR – Rothamsted – Harpenden – UK**

**La dynamique de l'azote dans le sol – Impact des  
pratiques agricoles**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

**"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"**

Pratiquement toutes les formes d'activité de production aboutissent à des pollutions particulières, et l'agriculture n'y fait pas exception. Elle entraîne des nitrates et des phosphates vers les eaux naturelles et des oxydes d'azote gazeux dans l'atmosphère. Les pertes de nitrate vers les eaux ont provoqué des inquiétudes généralisées et des dépenses importantes, à la fois des gouvernements et de l'industrie. Les modes d'exploitation du sol ont des répercussions fortes sur la production de nitrates dans le sol et la perte de nitrate du sol dans l'air et dans l'eau, que ces nitrates soit minéralisés dans le sol ou proviennent des engrais. Les stratégies de gestion des nitrates dans l'environnement dépendent donc d'une bonne compréhension du comportement des nitrates dans les sols et de l'influence des pratiques agricoles sur celui-ci. Cet article donne un bref aperçu de cette compréhension, dans l'état actuel des connaissances.

Le "problème des nitrates" (Nitrate Problem) qui est le thème central de cette conférence, est essentiellement un problème de nitrate "inopportun"(untimely) : le nitrate qui se trouve au mauvais endroit, au mauvais moment. Une grande partie de ce texte, traitera des raisons pour lesquelles le nitrate est présent et comment le problème peut être évité. Les nitrates sont présents dans le sol, parce que ils ont été apportés en tant que fertilisants, ou parce qu'ils ont été produits par la population microbienne, fongique et d'invertébrés du sol, et, de plus en plus, parce qu'ils ont été déposés par l'atmosphère.

Les études dans lesquelles, l'azote des fertilisants est marqué (ou tracé) avec l'isotope 15 de l'azote, montrent qu'environ 70% de l'azote apporté à un blé d'hiver (normalement près de 200 kg/ha), se retrouvent dans le grain et la paille. Les chaumes et les racines restant dans le sol ainsi que les exsudats racinaires contiennent près de 15% de l'engrais sous forme organique. Seulement 1% se retrouve sous forme minérale (nitrate et ammoniacale), le reste étant perdu par dénitrification ou lessivage. Le climat détermine quelle voie de perte prédomine, à chaque saison, mais, en moyenne, près des 2/3 sont perdus par dénitrification et un tiers par lessivage. Les pertes directes par lessivage des engrais sont donc relativement faibles, généralement de l'ordre de 5 à 6%. La betterave sucrière est même plus efficace que le blé d'hiver pour la réduction des pertes de nitrate, mais d'autres cultures, notamment les pommes de terre, le sont beaucoup moins.

Les entraînements directs ne sont pas les seuls problèmes. L'azote des engrais, qui reste sous forme organique, peut éventuellement être reminéralisé, à un moment potentiellement inopportun. De telles pertes indirectes par lessivage peuvent devenir importantes, si l'azote des engrais s'accumule dans les résidus organiques pendant une longue période. Cette accumulation peut également être perçue comme un accroissement de la fertilité.

La quantité relativement limitée d'azote lessivé, évoquée pour le blé d'hiver, peut s'accroître sévèrement si un excès de fertilisant est apporté. Cet aspect, comme la possibilité de lessivage indirect, suggère qu'une des clés essentielles de la gestion du problème des nitrates porte sur l'évaluation précise des besoins d'azote. Ceci est un sujet qui a été abondamment développé, et les modèles informatiques prennent une part importante et croissante dans l'aide à la décision de l'application d'engrais.

Les microorganismes qui sont responsables de la minéralisation de la matière organique du sol, l'accomplissent quand les conditions leur sont favorables, plutôt que quand les cultures en ont besoin. Ils apprécient particulièrement les conditions qu'ils trouvent lorsque le sol réchauffé par l'été, est réhumidifié au début de l'automne, mais c'est justement à ce moment que le nitrate est le plus indésirable. Le sol cultivé ne présente pas de végétation à cette période et la pluie va rapidement percoler à travers le sol pendant quatre à six mois. Ce nitrate produit naturellement est généralement responsable de la part principale du nitrate lessivé du sol, plutôt que l'azote des fertilisants apporté au printemps aux cultures en croissance; ainsi, le maintien d'un couvert végétal et la gestion de la minéralisation sont deux éléments clé supplémentaires pour régler le problème des nitrates.

La couverture végétale est plus efficacement assurée avec les prairies, et peu de nitrate est perdu dans les eaux de drainage, quand l'herbe est exploitée en foin ou en ensilage, même avec des apports passablement élevés d'engrais azoté. La prairie est cependant utilisée souvent pour le pâturage, et l'introduction des animaux rend le système beaucoup moins étanche vis à vis des nitrates. Ceci s'explique du fait que les animaux pâturent l'essentiel de la surface, mais excrètent seulement sur quelques secteurs peu étendus créant ainsi des zones sur lesquelles beaucoup plus d'azote est déposé que les plantes ne peuvent en absorber. L'excès d'azote dans ces zones, est facilement transformé en nitrate par la biologie du sol et lessivé.

La couverture végétale des sols peut être assurée, dans un système de culture en semant, tôt en saison, des cultures d'hiver. Ceci constitue maintenant une technique usuelle pour de nombreux agriculteurs, mais elle a été suspectée de transférer des maladies d'une culture à l'autre. Les "cultures pièges à nitrates"

peuvent aussi être pratiquées pendant l'automne et le début de l'hiver, pour prélever les nitrates du sol avant leur fuite, mais celles-ci présentent deux inconvénients. Le premier porte sur l'utilisation de l'eau qui aurait été, sinon, utilisée par la culture suivante, le second concerne la disponibilité des nitrates prélevés par les plantes qui, souvent, ne sont pas relargués assez rapidement pour profiter à la culture suivante, après labour de printemps.

La minéralisation est un processus entièrement naturel, et elle peut être aménagée seulement dans certaines limites. Le nitrate est produit dans le sol sans aucune intervention humaine. Des mesures faites au Centre de Recherche de Rothamsted montrent que, déjà dans les années 1870, la composition en nitrate des eaux de drainage d'un sol non cultivé qui n'avait reçu aucune fertilisation depuis au moins dix ans, dépassait la limite actuelle de 50mg/l. Ce nitrate avait été produit dans le sol, par la minéralisation de la fraction azotée de la matière organique. Tout effort de gestion de la minéralisation de l'azote implique évidemment la limitation des apports de résidus azotés s'accumulant dans le sol, et ceci peut constituer un des avantages d'applications d'engrais soigneusement ajustées. Le labour est aussi à prendre en compte, car il peut assurer l'enfouissement des pailles après récolte.

Le labour est bien connu pour favoriser la minéralisation du carbone et de l'azote de la matière organique, dans le sol, en exposant des agrégats du sol, auparavant enfouis, à l'oxygène et aux microorganismes, et en apportant à ces derniers, de nouvelles sources d'énergie. Les différents modes de labours varient considérablement sur l'aspect modification de la structure du sol et sur l'intensité de celle-ci. Ils diffèrent aussi sur les quantités d'énergie qu'ils apportent au sol. Ces différences influent sur les microorganismes et les animaux du sol qui effectuent la minéralisation et qui métabolisent le carbone et l'azote organiques. Il est bien possible que l'effet général du labour consiste à augmenter l'apport de nitrate dans le sol, souvent à l'automne quand il est susceptible de se lessiver. Cette difficulté est levée si le labour incorpore dans le sol, la paille non récoltée (qui ne doit plus être brûlée en Europe). La paille contient peu d'azote, et les microorganismes du sol utilisent les ions nitrates, quand ils la dégradent, réduisant ainsi, la quantité à risque.

Nous pouvons résumer ce texte, en disant que la gestion du problème des nitrates, consiste dans des bonnes pratiques agricoles qui limitent les quantités d'azote dans le sol tout au long des saisons et, spécialement, lors du début de la période de lessivage hivernal.

Practically all forms of productive activity lead to pollution of some kind, and farming is no exception. It loses nitrate and phosphate to natural waters and gaseous nitrogen oxides to the atmosphere. Losses of nitrate to water have caused widespread concern and large expenditure by both governments and industry. The way the land is managed has a strong effect on the production of nitrate in the soil and the loss of both soil-produced and fertilizer nitrate from the soil to air and water. Strategies for managing nitrate in the environment therefore depend on a clear understanding of the behaviour of nitrate in the soil and the influence on this of agricultural practice. This paper gives a brief account of this understanding as it stands at present.

The 'nitrate problem' with which this conference is concerned is essentially a problem of *untimely* nitrate, nitrate which is in the wrong place at the wrong time. Much of this paper is concerned with why it is there and how the problem can be avoided. Nitrate is present in the soil because it has been applied as fertilizer, because it has been produced by the soil's population of microbes, fungi and invertebrates or, increasingly, because it has been deposited from the atmosphere.

Studies in which nitrogen from fertilizer is labelled (or 'tagged') with the isotope <sup>15</sup>N show that roughly 70 percent of the nitrogen (normally about 200 kg/ha) applied to winter wheat crops is recovered in the harvested grain and straw. Stubble and roots remaining in the soil together with any material exuded from the roots contain about 15 percent of the fertilizer in organic form. Only one percent remains as mineral nitrogen (nitrate + ammonium) and the rest is lost by denitrification or leaching. The weather determines which loss pathway predominates in a particular season but, on average, about two thirds of the loss is by denitrification and one third by leaching. Direct leaching losses from fertilizer are therefore relatively small, commonly as little as 5-6 percent. Sugar beet is even more efficient than winter wheat at restricting nitrate losses, but some other crops, notably potatoes, are much less efficient.

Direct leaching losses are not the only problem. The fertilizer nitrogen, which remains in organic form, will eventually be re-mineralized, possibly when it is most untimely. Such indirect leaching losses can become important if fertilizer nitrogen accumulates in organic residues over a long period of time. This accumulation can, of course, also be regarded as an increase in soil fertility.

The relatively small direct leaching loss cited for winter wheat can increase sharply if too much nitrogen fertilizer is applied. This, together with the possibility of indirect losses, suggests that one of the keys to managing the nitrate problem is the correct assessment of the amount of nitrogen needed. This is a topic which has attracted great attention, and computer models are playing an increasingly important part in decision-support for fertilizer application.

The microorganisms that are active in mineralizing soil organic matter do so when the conditions suit them rather than when crops need nitrogen. They particularly enjoy the conditions which they find when soil warm from the summer is re-wetted during early autumn, but this is just when the nitrate they produce is most untimely. Arable soil is bare of vegetation at that time and rain will soon be percolating through it for four to six months. This naturally-produced nitrate is usually responsible for a larger proportion of the nitrate leached from the soil than fertilizer nitrogen applied to growing crops in spring, so maintaining vegetative cover and managing mineralization are two further keys to managing the nitrate problem.

Vegetative cover is most effectively maintained in grassland, and little nitrate is lost in drainage when grass is grown to be harvested as hay or silage, even with fairly large applications of nitrogen fertilizer. Grass is, however, commonly used for grazing, and the introduction of animals makes the system far more leaky with respect to nitrate. This happens because the animals graze most of the area but excrete on small areas of it, causing patches on which far more nitrogen is deposited than the grass can absorb. The surplus nitrogen in these patches is readily converted to nitrate by the soil population and leached.



Vegetative cover can be extended in arable systems by sowing winter crops early. This is now standard practice for many farmers, but it has been suggested to cause diseases to be carried over from one crop to the next. 'Catch crops' can also be grown during autumn and early winter to pick up nitrate from the soil before it is lost, but these have two problems. One is that they use water that would otherwise have been available to the following crop, and the other is that when they are ploughed into the soil in spring, as usually happens, the nitrate they have trapped is not released quickly enough to benefit the following crop.

Mineralization is an entirely natural process, and it can be managed to only a limited extent. Nitrate is produced in the soil without any human intervention. Measurements made at Rothamsted showed that, even back in the 1870s, nitrate concentrations in water draining from an unploughed soil that had received no nitrogen fertilizer for at least ten years exceeded the present-day EC limit of  $50 \text{ g m}^{-3}$ . This nitrate was produced by the mineralization of nitrogen-containing organic matter in the soil. Any attempt at managing the mineralization of nitrogen clearly involves limiting the amount of nitrogenous residues accumulating in the soil, and this should be one of the benefits of carefully-managed fertilizer applications. It can also involve tillage, which may include the incorporation of straw after harvest.

Tillage is well known to enhance the mineralization of carbon and nitrogen in organic matter in the soil by exposing previously unexposed soil surfaces to oxygen and microbes and by providing the latter with new sources of energy. The various tillage systems differ considerably in the way they modify the soil structure and the extent to which they do so. They also differ in the amounts of energy they put into the soil. These differences have an impact on the microbes and soil animals which bring about mineralization as they metabolize organic carbon and nitrogen. The overall effect of tillage is likely to be to increase the amount of nitrate in the soil, often in autumn when it is vulnerable to leaching. This problem is alleviated if the tillage incorporates unharvested straw (which can no longer be burnt in Europe) into the soil. Straw contains little nitrogen, and soil microbes utilize nitrate when they break it down, thereby lessening the amount at risk.

We can summarize this paper by saying that managing the nitrate problem is a matter of good agricultural practice which minimizes the amount of nitrate in the soil throughout the season and especially as the winter leaching period approaches

**Table ronde**

**animée par :**

**Professeur Jean-Claude REMY,**

**Professeur Elvira LOPEZ MOSQUERA – Monsieur Michel LE ROUX**

**Nitrates, activités agricoles, eutrophisation et  
pollution diffuse ?**

## MODULE 3

NITRATES ET OPINION PUBLIQUE - QUELS RISQUES ?

*Président de séance :*

**Professeur Edmond-Antoine DECAMPS :**

*Groupe Physique Environnement – Université de Rennes*

- QUALIBIO -

**Maître Bertrand BURG**

Cabinet HUGLO/LEPAGE – PARIS

**Normes, directives et jurisprudence**

**QUALITE DE L'EAU ET NITRATES : ASPECTS  
JURIDIQUES**

- Assises ENVIROBIO 2000 -

"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

- QUALIBIO -

La nouvelle directive "eau potable" n°98/83/CEE du Conseil du 3 novembre 1998, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, abroge à compter de son entrée en vigueur la directive n°80/778/CEE.

Toutefois, l'entrée en vigueur de cette nouvelle directive n'est prévue que cinq ans après son adoption, soit le 3 novembre 2003.

A compter de cette date, les Etats membres disposeront d'un délai de deux ans pour transposer les dispositions de cette directive, des dispositions spéciales étant prises pour assurer la conformité de l'eau distribuée dans les Etats membres aux paramètres plomb précisés dans l'annexe I.B de la directive.

Le champ d'application de la directive est extrêmement large puisque sont concernées les eaux de boisson, qu'elles soient distribuées par un réseau d'adduction ou bien en bouteille (à l'exception des eaux considérées comme eaux minérales naturelles ou eaux médicinales) ainsi que les eaux utilisées dans l'industrie alimentaire *"sauf s'il peut être établi que l'utilisation de ces eaux n'affecte pas la salubrité du produit fini"* (considérant n°7).

De plus, la directive pose le principe selon lequel le respect des valeurs paramétriques doit être assuré au point où les eaux destinées à la consommation humaine sont mises à la disposition du consommateur concerné c'est à dire, si besoin est, à la sortie du robinet (article 6 paragraphe 1, a & considérant n°21).

Bien plus, la nouveauté de la directive est d'obliger les Etats, d'une part à prendre les mesures nécessaires pour déterminer les causes et mettre en place les mesures correctives lorsque les paramètres définis aux annexes ne peuvent être respectés dans une partie d'un Etat membre et, d'autre part, permet aux Etats membres d'organiser des dérogations *"dans la mesure où aucune dérogation ne constitue un danger potentiel pour la santé des personnes et où il n'existe pas d'autres moyens raisonnables de maintenir la distribution des eaux destinées à la consommation humaine dans le secteur concerné"* (article 9, paragraphe 1).

Dans le même temps, la directive fait obligation aux Etats membres d'instituer toutes les mesures utiles de façon à ce que l'eau distribuée ou destinée à la consommation humaine ne présente aucun danger pour la santé, quelle que soit par ailleurs la conformité de cette eau aux paramètres fixés en annexe de la directive (moins nombreux que les paramètres fixés par la précédente directive).

Il est prévu à ce titre, lorsqu'un Etat membre décide d'instituer des paramètres complémentaires à ceux prévus par les annexes de la directive ou bien de diminuer les valeurs des paramètres existants dans les maxima admissibles, une procédure d'information de la Commission.

Enfin, la fixation des paramètres est justifiée par les considérants de la directive, au regard des orientations de l'Organisation Mondiale de la Santé relatives à la qualité des eaux potables ainsi que sur l'avis du Comité Scientifique Consultatif de la Commission pour l'examen de la toxicité et de l'éco-toxicité des composés chimiques.

Par ailleurs, il est rappelé (considérant n°13) que *"les valeurs paramétriques reposent sur les connaissances scientifiques disponibles et que le principe de précaution a également été pris en considération ; que ces valeurs ont été choisies pour garantir que les eaux destinées à la consommation humaine peuvent être consommées sans danger pendant toute une vie et qu'elles offrent donc un degré élevé de protection sanitaire"*.

**C'est donc une directive assez contrastée dont une des caractéristiques est de fixer deux critères pour qu'une eau puisse être propre à la consommation humaine, d'une part qu'elle respecte les paramètres fixés en annexe de la directive, d'autre part qu'elle ne présente aucun danger pour la santé humaine.**

Ce second critère englobe d'une certaine façon le premier puisqu'il est expressément prévu que c'est au regard de la protection de la santé humaine que sont fixés les paramètres en annexe.

Il convient en outre, de préciser que deux aspects connexes résultent de modifications législatives récentes en France, à savoir :

- la responsabilité du fait des produits défectueux prévue par la loi n°98-389 du 19 mai 1998 insérant les articles 1386-1 à 1386-18 dans le Code Civil,
- la loi n°98-535 du 1<sup>er</sup> juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme, modifiant et complétant le livre VIII du Code de la Santé Publique par un chapitre IX instituant notamment une agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Cette dernière loi a été complétée par un décret n°99-242 du 26 mars 1999.

En revanche, il ne semble pas que le dispositif législatif et réglementaire mis en place pour prévenir les risques de saturnisme ait une incidence directe dans l'immédiat sur les règles relatives à la distribution de l'eau.

En effet, les décrets du 11 juin 1999 ne concerne que les peintures au plomb, et les poussières qu'elles provoquent.

Ces deux dispositifs ne sont pas sans incidence sur les régimes de responsabilité en cause du fait de la présence de nitrate à des teneurs supérieures aux normes admises dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Les règles relatives à la responsabilité, sur laquelle la directive n'aura semble-t'il qu'un effet indirect, découlent de deux éléments :

- Les consommateurs sont dans une relation contractuelle avec le distributeur
- La distribution de l'eau est un service public industriel et commercial assuré par les communes (ou leur délégués).
- La réglementation européenne laisse aux états membres de l'UE le pouvoir de fléchir

#### **I Une responsabilité renforcée du producteur ou du distributeur d'eau**

Par la qualification de l'obligation de résultat  
Par une nouvelle définition du préjudice

#### **II Une responsabilité potentielle de l'Etat et des collectivités locales**

Par la possibilité de fixer les normes et non de les subir  
Par l'obligation de protection de la ressource

- QUALIBIO -

**Docteur Roger BATE**

European Science and Environment Forum ESEF –  
Cambridge – United Kingdom

**Connaissances scientifiques et réglementation :  
impacts économiques.**

- Assises ENVIROBIO 2000 -  
"Gestion des risques Santé et Environnement : Le cas des Nitrates"

**Professeur Jean-Jacques DUBY**

SUPELEC – GIF sur Yvette.

**Le principe de précaution et la hiérarchisation des  
risques ? :  
risque réel et risque négligeable**



- QUALIBIO -

The definition of a 5 mg/kg b.w. ADI for sodium nitrate and the consequent regulation of 50 mg/l maximum content of nitrate in drinking water can be viewed as a perfect case study for flawed application of the precautionary principle :

- Poor scientific basis, founded only on animal experiments, with no proposed physiological explanation of the feared pathogenic process.
- Lack of scientific ground for extension of animal model to humans, extrapolation to low doses and safety margins.
- Lack of any economic factors consideration.
- Lack of follow up programs for further biological research and epidemiological studies.
- *Ex post* scientific and epidemiological results not taken into account for later revision of ADI standards and regulations.
- Generation of public fears by political gesturing and media amplification.

As of today, sodium nitrate regulations are yet another example of the *de facto* irreversibility of precautionary measures.

La définition de la dose journalière admissible pour le nitrate de sodium, à 5 mg/kg de poids corporel et la norme sur la teneur maximale en nitrate dans l'eau de boisson qui en découle, fixée à 50 mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> peuvent être considérées comme un cas d'école de mauvaises pratiques dans l'application du principe de précaution :

- bases scientifiques fragmentaires, sur la seule base d'expérimentations animales,
- absence d'explication physiologique du mécanisme pathogène redouté,
- absence de base scientifique pour l'extension du modèle animal à l'homme, l'extrapolation pour les faibles doses et l'établissement de marges de sécurité,
- absence de considération pour le moindre facteur économique,
- absence de programmes de suivi pour des recherches biologiques complémentaires et pour des études épidémiologiques,
- absence de prise en compte des nouveaux résultats scientifiques et épidémiologiques, pour des réajustements ultérieurs de la DJA et la réglementation,
- création d'angoisse collective à partir de l'attitude des politiques et de l'amplification des médias.

Jusqu'à ce jour, la réglementation sur les nitrates est encore une illustration supplémentaire, *de facto*, de l'irréversibilité des mesures de précaution.

**Monsieur Jean SALMON et Monsieur Louis CAYEUX**

FNSEA – Fédération Nationale des Syndicats Exploitants Agricoles

**L'attente du monde agricole face aux scientifiques et  
à la réglementation par un responsable du  
syndicalisme agricole**

- QUALIBIO -

**Monsieur Eric AVRIL et Monsieur Claude SOCIAS**

A.F.O.C. - Association Force Ouvrière Consommateurs  
**PARIS**

**Le point de vue des consommateurs**

**Monsieur Dominique BUREAU**

Direction des Etudes Economiques de l'Evaluation Environnementale au  
Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

**Efficacité de la politique Sanitaire et  
Environnementale**

**- QUALIBIO -**

**Table ronde**

**animée par Christophe SIBIEUDE  
(Environnement et Technique)**

**avec :**

**Professeur Thomas ADDISCOTT, Professeur Marian APFELBAUM,  
Professeur Christian CABROL, Professeur Jean-Jacques DUBY,  
Professeur Maurice TUBIANA,**

**Controverse – opinion publique et connaissance  
scientifiques ; risques et société**

- QUALIBIO -

## ***Synthèse et recommandations***

**M. Josselin De Rohan**

*Président du Conseil Régional de Bretagne*

**M. Dominique GARRIGUES**

*Animateur de la Commission Environnement de  
Démocratie Libérale.*

**M. Claude HURIET**

*Sénateur de Meurthe et Moselle – Questeur du Sénat*

**Le point de vue des politiques : connaissances  
scientifiques / décisions**



- QUALIBIO -

*DEBAT*

**- QUALIBIO -**

## **Clôture des Assises**

**Par Monsieur Philippe NOGRIX**

**Sénateur d'Ille et Vilaine**