

Maisons-Alfort, le 28 janvier 2004

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au rapport d'évaluation initiale des Pays-Bas sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché de produits alimentaires issus d'un maïs génétiquement modifié B.t. CRY1F lignée 1507 au titre du règlement (CE) n°258/97 (alimentation humaine)

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 décembre 2003 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif au rapport d'évaluation initiale des Pays-Bas sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché de produits alimentaires issus d'un maïs génétiquement modifié B.t. CRY1F lignée 1507 au titre du règlement (CE) n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

Cette demande de mise sur le marché porte sur une lignée de maïs B.t. CRY1F lignée 1507 (TC 1507) obtenue par introduction de deux gènes permettant l'expression de deux protéines, la protéine CRY1F conférant la résistance à certains lépidoptères et à la chrysomèle et la protéine PAT conférant la tolérance à un herbicide, le glufosinate.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 22 janvier 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

Informations relatives à la modification génétique et à la plante génétiquement modifiée

Considérant que :

- la construction introduite dans le génome nucléaire du maïs par biolistique est constituée de deux gènes, le gène *cry1F*, isolé de *Bacillus thuringiensis ssp aizawai*, codant la protéine tronquée CRY1F et conférant la résistance à certains lépidoptères et le gène *pat*, isolé de *Streptomyces viridochromogenes*, codant la protéine phosphinotricine acétyl transférase et conférant la tolérance au glufosinate-ammonium,
- le gène *cry1F* est contrôlé par le promoteur constitutif de l'ubiquitine du maïs et le gène *pat* par le promoteur constitutif 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur,
- plusieurs séquences réarrangées, issues de la construction elle-même, sont venues s'ajouter de part et d'autre de celle-ci (5 fragments du côté 5' représentant 807 paires de base (bp) et 2 fragments du côté 3' représentant 738 bp),
- dans le génome du maïs, il y a une seule insertion (vérifiée par hybridation de type Southern) et cette insertion contient une seule construction,
- l'ADN ayant servi à la transformation ne contenait pas le gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine,
- la stabilité de l'insert a été vérifiée sur 6 générations ;

Considérant que :

- le séquençage de l'insert dans le génome du maïs ainsi que celui des séquences bordures côtés 5' (1681 bp) et 3' (271 bp) en amont et aval de l'insertion ont été réalisés,
- la comparaison des séquences¹ de 280 bp en amont et 271 bp en aval avec les séquences disponibles dans les bases de données montre que ces séquences présentent de forte similitude avec les séquences du génome du maïs,

¹ Cette comparaison informatique a été effectuée par le rapporteur

- la comparaison de la séquence du maïs en 5' jointe à celle située en 3' (soit 552 bp) montre une forte similitude avec les séquences du maïs, confirmant ce qui a été observé ci-dessus ;

Considérant qu'une analyse des ORF potentielles (open reading frame) a été réalisée : deux ORF potentielles (ORF 1 et 2) sont situées dans le génome du maïs hôte, une ORF potentielle (ORF 3) en bordure de l'insertion côté 5' et une ORF potentielle (ORF 4) dans la séquence de l'insert ; que cette analyse montre :

- pour l'ORF 3, l'absence de produit d'amplification et
- pour l'ORF 4, la possibilité d'obtenir un ARNm fonctionnel partant du gène *cry1F* et incluant l'ORF 4 ; cependant les résultats d'analyse de type Western ne mettent pas en évidence de protéine CRY1F de taille supérieure à celle attendue ;

Considérant que les séquences des peptides putatifs déduits de ces ORF potentielles ont été comparées avec les séquences de protéines disponibles dans les bases de données et qu'aucune de ces séquences putatives ne présente de similitude avec des allergènes, des toxines et/ou des peptides à effets pharmacologiques ;

Considérant que les séquences des peptides putatifs, déduits des ORF 3 et 4 potentiels, ont été comparées avec les séquences de protéines disponibles dans les bases de données et que pour :

- l'ORF 3, des homologies ont été trouvées avec 45 protéines, 18 correspondant à des séquences de l'ARN polymérase, présente dans de nombreuses plantes dont le maïs, les autres protéines correspondant à une phosphotransférase acétyl putative,
- l'ORF 4, des similitudes ont été trouvées avec 17 protéines dont 16 concernent la partie C-terminale du produit du gène ORF VI du virus de la mosaïque du chou-fleur, non impliqué dans les fonctions virales de ce virus végétal, et la dernière protéine putative présentant une faible similitude avec des données de séquences de *Plasmodium falciparum*,

aucune des protéines potentiellement traduites ne présente de risque ;

Informations relatives à la composition chimique du maïs grain et de la plante entière

Considérant que le maïs TC 1507 a fait l'objet de nombreux essais expérimentaux dans le monde notamment en 1998 et 1999 sur 4 sites au Chili, 3 sites en France, 2 sites en Italie et 1 en Bulgarie ;

Considérant que des différences statistiquement significatives de composition chimique sont observées pour les acides aminés (sur 1 site au Chili, 1 site en France et 2 sites en Italie) et l'acide linoléique (sur 1 site au Chili) par les analyses² réalisées sur le grain du maïs TC 1507 traité et non traité au glufosinate entre le maïs TC 1507 traité et non traité et la variété témoin présentant le même fond génétique sans les gènes *cry1F* et *pat* mais que ces variations de teneurs restent dans les fourchettes de variations observées dans les tables de composition des différents aliments ;

Informations relatives aux niveaux d'expression des protéines CRY1F et PAT

Considérant que les niveaux d'expression des protéines CRY1F et PAT ont été mesurés par la technique ELISA dans la feuille, le grain, la plante entière à différents stades de développement, le pollen et la tige de maïs TC 1507 provenant des sites expérimentaux en Europe (tableau 1) ;

² protéine brute, matière grasse, cendres, ADF, NDF, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, diverses vitamines, métabolites secondaires, acide phytique et facteurs anti-trypsique

Tableau 1. Teneurs moyennes en protéines exprimées CRY 1F et PAT dans le maïs TC1507 traité et non traité au glufosinate en Europe (ng de protéine/mg de tissu sec et écart type)

Organe	Maïs non traité au glufosinate Protéine CRY 1F	Maïs traité au glufosinate Protéine CRY 1F	Maïs non traité au glufosinate Protéine PAT	Maïs traité au glufosinate Protéine PAT
Feuille ⁽¹⁾	12,1 (sd : 6,2)	14,2 (sd : 6,9)	3,8 (sd : 3,0)	5,2 (sd : 2,6)
Grain ⁽¹⁾	2,2 (sd : 0,8)	2,5 (sd : 0,9)	0,00	0,00
Tige ⁽¹⁾	5,8 (sd : 1,7)	5,8 (sd : 1,5)	0,08 (sd : 0,15)	0,083 (sd : 0,109)
Plante entière ⁽²⁾	5,2 (sd : 1,9)	6,0 (sd : 2,9)	0,006 (sd : 0,013)	0,048 (sd : 0,060)
Plante sénescence ⁽²⁾	1,6 (sd : 0,6)	1,7 (sd : 0,6)	0,00	0,003 (sd : 0,006)

⁽¹⁾ 6 sites : 3 en France, 2 en Italie, 1 en Bulgarie (soit 30 échantillons)

⁽²⁾ 5 sites : 2 en France, 2 en Italie, 1 en Bulgarie (soit 5 échantillons)

Considérant que les teneurs en CRY1F peuvent varier d'un site à l'autre avec un écart-type (sd) élevé pour des valeurs moyennes comparables, que les teneurs en protéine CRY1F sont plus élevées dans les organes végétatifs que dans le grain maïs qu'elles ne sont pas affectées par le traitement de la plante au glufosinate pendant son développement ;

Considérant que les teneurs en protéine PAT sont inférieures à la limite de détection notamment dans le grain et la plante sénescence ;

Informations relatives à la dégradation *in vitro* et au potentiel allergénique des protéines

Considérant que la protéine CRY1F produite par *Pseudomonas fluorescens* (qui sera utilisée pour les essais de dégradation et de toxicité aiguë) a été démontrée équivalente à la protéine isolée d'un maïs TC 1360 possédant le même transgène *cry1F* que le maïs TC 1507 (la protéine CRY1F du maïs TC 1360 présente les mêmes propriétés en terme de structure biochimique, d'activité biologique, d'immunoréactivité et d'absence de modification post-traductionnelle (glycosylation) que celle synthétisée par *Pseudomonas fluorescens*) ;

Considérant que les protéines PAT et CRY1F, soumises à des tests de digestion protéolytique *in vitro*, sont dégradées en moins de 5 à 15 secondes (modèle fluide gastrique simulé) ;

Considérant cependant que :

- la protéine CRY1F, soumise à des tests de digestibilité dans un modèle de fluide intestinal simulé (SIF) n'est pas dégradée après 120 minutes,
- sur trois autres protéines testées dans les mêmes conditions : la phosphatase acide (non allergénique), l'ovalbumine et la β -lactoglobuline (toutes deux allergisantes), la phosphatase acide et l'ovalbumine ne sont pas dégradées alors que la β -lactoglobuline disparaît en 1 minute ;

Considérant que le caractère allergénique potentiel des protéines CRY1F et PAT a été évalué sur la base de recherche de similitude de séquences protéiques portant sur 8 acides aminés consécutifs et qu'aucune similarité n'a été observée entre la structure primaire de ces protéines et celles des protéines connues comme étant des allergènes ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation *in vitro* des protéines et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, pour conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine ;

Etude de toxicité et de tolérance chez le rat

Considérant que la protéine PAT a déjà fait l'objet d'une étude de toxicologie aiguë (administration unique) chez le rat (en vue des autorisations des maïs BT176 et T25 tolérant au

glufosinate) et qu'aucun effet néfaste n'a été observé à la dose maximale de 50.000 mg/kg p.c. ; qu'une autre étude de toxicologie aiguë (administration unique) chez la souris n'a pas mis en évidence d'effet néfaste à la dose maximale de 5000 mg/kg p.c. ;

Considérant que la protéine CRY1F a fait l'objet d'une étude de toxicologie aiguë (administration unique) chez la souris et qu'aucun effet néfaste n'a été observé à la dose maximale de 576 mg/kg p.c. ;

Considérant qu'une étude de tolérance a été réalisée durant 90 jours sur des rats des deux sexes (12 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain TC 1507 en comparaison avec un maïs "isogénique" et 1 variété commerciale de maïs (taux d'incorporation 33 %) ;

Considérant que l'analyse chimique du maïs incorporé et des rations complètes a été effectuée, y compris la recherche de résidus de pesticides, de métaux lourds et de mycotoxines ;

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres urinaires et sanguins ont été mesurés au cours de l'étude, que des tests neurobiologiques et fonctionnels et des observations cliniques ont été pratiqués, qu'au moment du sacrifice (après 90 jours), des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique des organes (poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur divers organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique ;

Etude de tolérance et de valeur alimentaire chez l'animal cible

Considérant qu'une étude a été réalisée sur 245 poulets en croissance pendant 42 jours (35 animaux par traitement), consistant à étudier l'effet d'une alimentation contenant 54,21 % (0 à 21 jours), puis 57,03 % (22 à 42 jours) de maïs grain TC 1507 (teneur en CRY1F : 2,8 ng/mg) en comparant la mortalité, les performances de croissance et d'efficacité, avec les résultats d'une alimentation contenant du maïs grain TC 1360 (teneur en CRY1F : 3,2 ng/mg), un maïs hybride témoin et 4 variétés commerciales de maïs ;

Considérant qu'aucune différence significative n'ayant été observée entre les résultats obtenus pour le maïs TC 1507 et les autres variétés de maïs, on peut donc conclure à l'équivalence nutritionnelle de la nouvelle plante avec les variétés témoins ;

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime qu'en se fondant sur le rapport d'évaluation initiale néerlandais et sur les résultats présentés qui ne mettent pas en évidence d'effet chez le rat nourri pendant 90 jours avec du maïs grain TC 1507, ni chez le poulet nourri pendant 42 jours avec ce même maïs, permettant ainsi de conclure à l'équivalence nutritionnelle entre le maïs génétiquement modifié et les variétés témoins, les conclusions du pays rapporteur peuvent être suivies : "en l'état actuel des connaissances scientifiques, la consommation de maïs B.t. CRY1F lignée 1507 et de ses dérivés présente le même niveau de sécurité sanitaire pour l'homme que la consommation de maïs non génétiquement modifié et de ses dérivés".

Avis minoritaire

Trois experts considèrent que, compte tenu des différences importantes de métabolisme entre la lignée de maïs expérimentale, avec laquelle ont été faites les études de toxicité 90 j sur le rat et de tolérance sur le poulet (42 j), et les variétés de maïs doux qui seront commercialisées, la consommation de maïs doux ne peut pas être considérée comme présentant le même niveau de sécurité sanitaire que les autres produits et dérivés du maïs B.t. CRY1F lignée 1507.

Martin HIRSCH