

Maisons-Alfort, le 21 avril 2004

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un riz
contenant l'évènement LLRice62, tolérant au glufosinate Liberty
en vue de son importation et de son utilisation
à des fins d'alimentation animale, à l'exclusion de la culture,
au titre de la directive 2001/18/CE**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 10 mars 2004 par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'avis relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un riz contenant l'évènement LLRice62, tolérant au glufosinate Liberty en vue de son importation et de son utilisation à des fins d'alimentation animale, à l'exclusion de la culture, au titre de la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement - partie C article 15. Le dossier a été déposé auprès des Autorités compétentes du Royaume-Uni sous la référence [C/GB/03/M5/3].

La demande de mise sur le marché porte sur un riz génétiquement modifié par introduction du gène *bar* qui code la protéine PAT conférant la tolérance à un herbicide, le glufosinate d'ammonium.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 15 avril 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

Informations relatives à la modification génétique

Considérant que

- la construction introduite dans le génome nucléaire du riz par bombardement d'un fragment d'ADN de 1502 bp (paires de base), dérivé du plasmide pB5/35S*bar* et isolé à partir d'un gel d'électrophorèse en agarose, est constituée du gène *bar*, isolé de *Streptomyces hygrosopicus*, codant la protéine phosphinotricine acétyl transférase et conférant la tolérance au glufosinate d'ammonium, du promoteur et du terminateur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ;
- aucun autre élément du plasmide pB5/35S*bar*, notamment le gène *npIII*, n'est retrouvé dans le génome du riz (vérifié par hybridation de type Southern) ;
- les analyses menées par Southern et ségrégation génétique ont permis de montrer que l'insertion s'est effectuée au niveau d'un seul locus dans le génome de la plante et que cette intégration est stable au niveau génétique sur plusieurs générations, après culture dans différents environnements, et après croisement avec différentes variétés génétiques ;

Considérant que

- l'analyse de séquence et la comparaison avec les banques de données génétiques ont permis de localiser le site d'insertion dans l'évènement LLRice62 au niveau du chromosome 6 du génome de la plante et que cette insertion s'est accompagnée d'une délétion de 18 bp dans l'ADN de la plante ;
- la séquence insérée est identique à la séquence présente dans le vecteur portant le fragment ayant servi à la transformation ;
- la séquence de l'insert dans le génome du riz ainsi que les séquences bordures côtés 5' (149 bp) et 3' (670 bp) de l'insert ont été déterminées ;
- la recherche de similarité des séquences bordures de l'insert montre que

- * en amont du gène *bar* (côté 5'), l'insertion s'est faite dans un gène qui appartient à une large famille de gènes ayant probablement des fonctions redondantes, ce qui expliquerait le fait qu'aucune incidence négative pour la plante n'ait été observée ;
- * en aval du gène *bar* (côté 3'), il existe une similarité avec une séquence codant pour un ARN de transfert (ARNt) située 403 bp en aval du site d'insertion qui ne serait pas affecté dans son expression. Cette hypothèse a été confirmée par les analyses en Northern blot qui montrent une transcription du gène ;
- la recherche des ORF (open reading frame) de part et d'autre du site d'insertion (séquences génomiques en 5' et 3' au point d'insertion avec la séquence réellement insérée) par bioanalyse a permis d'identifier 8 ORF côté 5' dont une présente une similarité avec une séquence protéique d'*Oryza sativa* et 7 ORF côté 3' dont 4 présentent une similarité avec 4 séquences protéiques connues ; que dans chacune de ces séquences, aucun codon d'initiation n'est situé dans un contexte permettant une traduction efficace dans les monocotylédones ;
- l'analyse par Northern blot a démontré l'absence d'ARN transcrits à partir des fragments de bordure côté 5' et côté 3' quels que soient les tissus testés (feuilles, tiges, racines, graines), confirmant que les ORF putatives identifiées dans ces régions ne peuvent donc être considérées comme biologiquement fonctionnelles ;

Considérant cependant que la description du gène dans lequel a eu lieu l'insertion ainsi que la position de l'insertion dans ce gène ne sont pas clairement explicitées ;

Informations relatives à la composition chimique du riz

Considérant que des analyses de composition [protéines totales, fractions protéiques, acides aminés, lipides totaux, acides gras, oryzanol, fibres (NDF¹, ADF²)] minéraux et vitamines, facteurs antinutritionnels : acide phytique, inhibiteur de trypsine, lectines) ont porté sur des récoltes effectuées sur 14 sites géographiques différents aux USA et sur deux années et que sont comparées :

- la lignée parentale Bengale,
- la lignée génétiquement modifiée LLRice62,
- la lignée génétiquement modifiée LLRice62, traitée au glufosinate ;

Considérant que ces analyses ont toujours porté sur les grains entiers ainsi que sur différentes fractions d'usinage et produits traités : enveloppes, riz brun, riz brun étuvé, riz usiné, son ... sans que des différences liées au traitement par le glufosinate soient observées :

- 1 sur les grains entiers** : pas de différences significatives sauf quelques écarts assez faibles et non systématiques concernant
 - le fer,
 - la vitamine B₁,
 - la vitamine E,
 - quelques acides gras (en particulier l'acide érucique C22:1, qui ne représente que 0,15 à 0,30 % des acides gras totaux) ;
- 2 sur le riz blanchi (ou usiné)** : aucune différence significative ;
- 3 sur le son de riz** :
 - lipides, protéines fibres et cendres accusent des valeurs légèrement plus faibles dans le son du riz LLRice62 ; l'écart atteint cependant 20 % pour les fibres NDF et les lipides. Ces valeurs restent cependant toujours dans les limites de la variabilité observée chez le riz ;
 - concernant les facteurs antinutritionnels, malgré une légère augmentation non significative de l'acide phytique (dans le grain entier et le son) et des inhibiteurs de trypsine (dans le son), les valeurs restent dans les limites de la variabilité intraspécifique. Il convient de remarquer que les valeurs mesurées pour les inhibiteurs de trypsine et surtout pour les lectines sont très faibles et à la limite des seuils de sensibilité ;
- 4 dans l'huile** : aucune différence dans les profils d'acides gras ;

¹ NDF : teneur en paroi cellulaire estimée par le résidu obtenu à la suite d'un traitement contenant un détergent neutre

² ADF : résidu après traitement par un détergent acide

Considérant qu'au regard des résultats des analyses réalisées, les variations de compositions observées restant dans les fourchettes de variations publiées dans les tables de composition des différents aliments, il est possible de conclure à l'équivalence nutritionnelle entre le riz de la variété parentale Bengale et le riz LLRice62 traité ou non par le glufosinate ;

Informations relatives aux niveaux d'expression de la protéine PAT

Considérant que le dosage quantitatif de la protéine exprimée a été réalisé dans des conditions expérimentales rigoureuses : dans le grain, les feuilles, la tige et les racines, à plusieurs stades végétatifs et sur plusieurs sites de culture ;

Considérant que les teneurs moyennes en protéine PAT, exprimées par rapport à la matière fraîche, sont de 12,1 µg/g dans le grain et de 75,3 µg/g dans la tige, représentant respectivement 0,02 % et 0,32 % de protéines totales du grain et de la tige ;

Information relative à la dégradation *in vitro* et au potentiel allergénique de la protéine PAT

Considérant que la protéine PAT est thermostable : pas de dégradation après 60 minutes à 90 °C ;

Considérant que la protéine PAT, soumise à des tests de digestion protéolytique *in vitro*, est rapidement dégradée par les enzymes digestives après 30 secondes à pH 2 en présence de pepsine (modèle fluide gastrique simulé) et après 5 minutes à pH 7,5 en présence de pancréatine (modèle fluide intestinal simulé) ;

Considérant que le caractère allergénique de la protéine PAT a été évalué sur la base de recherche d'identité de séquences protéiques (35 % d'homologies sur une séquence de 80 acides aminés) avec celles de protéines toxiques ou allergènes répertoriées dans plusieurs bases de données ;

Considérant qu'il n'y a pas de similitude entre les sites de glycosylation potentielle de la protéine PAT avec ceux de protéines connues pour être allergènes ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et digestion *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 de la protéine PAT

Considérant que la seule étude disponible présentée dans le dossier est une étude de toxicité aiguë chez la souris femelle OF1, recevant par voie intraveineuse des doses de protéine PAT de 1 à 15 mg/kg de poids corporel, et qu'aucune toxicité ni mortalité n'ont été observées dans les 15 jours suivant l'administration unique de la protéine PAT, alors que la protéine de référence, la mélitine, entraîne 100 % de mortalité ;

Considérant cependant que ce test de toxicité aiguë par voie intraveineuse est difficilement acceptable au regard d'une évaluation de la sécurité alimentaire ;

Etude d'alimentarité chez le poulet de chair

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été effectuée sur 120 poulets de chair en croissance (60 poulets par traitement et 3 répétitions intra-groupe), nourris de 1 à 42 jours d'âge avec un aliment complet contenant soit 30 % de riz LLRice62, soit 30 % de riz témoin non OGM ;

Considérant qu'aucune différence significative relative à la mortalité, aux performances de croissance et d'efficacité, et à la composition des muscles pectoraux et de la cuisse n'a été observée entre les résultats obtenus chez les poulets nourris avec du riz LLRice62 ou avec le riz témoin ;

Considérant cependant que :

- les conditions de production du riz LLRice62 et son traitement ou non par l'herbicide ainsi que l'origine et les conditions de production du riz témoin ne sont pas précisées,
- l'analyse statistique des résultats ne mentionne pas les valeurs exactes des niveaux de signification de l'effet du groupe, ainsi qu'une mesure de la variabilité résiduelle (obtenue lors de l'analyse de variance) ; la présentation de ces valeurs aurait permis de mieux juger de la validité des mesures effectuées et de l'analyse de variance ;

Etude d'alimentarité chez le porc

Considérant qu'une seconde étude d'alimentarité a été réalisée sur 96 porcs (48 mâles et 48 femelles), à raison de 24 animaux par traitement, nourris pendant 100 jours avec du riz LLRice62 traité et non traité au glufosinate, la variété de riz Bengale non transformée et une variété commerciale de riz avec un taux d'incorporation à la ration 73, 80 et 85 % respectivement durant les trois phases d'engraissement classique du porc : 20 à 50 kg - 50-80 kg et 80-100kg ;

Considérant que :

- quelle que soit la phase d'engraissement, les résultats n'indiquent pas d'écarts majeurs significatifs entre les animaux nourris avec le riz LLRice62 traité ou non au glufosinate et la variété commerciale sur les performances de croissance ou d'indice de consommation et sur la qualité de la carcasse (rendement, état d'adiposité),
- un effet favorable significatif sur le poids vif et l'indice de consommation de la variété LLRice62 traité à l'herbicide par rapport à la variété parentale Bengale,
- un effet favorable sur le poids vif et l'indice de consommation de la variété OGM traitée par rapport à la variété OGM non traitée ;

Considérant cependant que les conditions de production du riz LLRice62, l'origine et les conditions de production des riz témoins ne sont pas précisées,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime qu'un avis scientifiquement fondé concernant la sécurité sanitaire d'une consommation animale de riz LLRice62 et de ses dérivés ne peut être rendu en l'absence des données suivantes :

- la description du gène dans lequel a eu lieu l'insertion ainsi que la position de l'insertion dans ce gène ;
- des informations relatives aux conditions de production du riz LLRice62 ainsi qu'à l'origine et aux conditions de production des riz témoins utilisés dans les études d'alimentarité sur poulet et porc ;
- en référence à l'analyse statistique de l'étude d'alimentarité sur poulet, les valeurs exactes des niveaux de signification de l'effet du groupe, ainsi qu'une mesure de la variabilité résiduelle (obtenue lors de l'analyse de variance) ;
- une étude de toxicité/tolérance sur rat nourri pendant 90 jours avec le riz LLRice62 traité et non traité par le glufosinate afin de confirmer, d'une part l'absence de toxicité de la protéine PAT, d'autre part l'absence d'effet néfaste sur la santé animale lié à une consommation régulière de ce riz. En effet, le seul essai de toxicité disponible est un essai de toxicité aiguë chez la souris par voie intraveineuse qui, en aucun cas, ne peut être retenu comme acceptable dans le cadre d'une évaluation de sécurité alimentaire.

Martin HIRSCH