

Maisons-Alfort, le 2 décembre 2005

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs
génétiquement modifié 59122 résistant à des insectes et tolérant à un herbicide,
pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains
et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 3 octobre 2005 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié 59122 résistant à des insectes et tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2005-12).

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Afssa.

Après consultation du Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 novembre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

Cette demande de mise sur le marché porte sur le maïs 59122 génétiquement modifié par l'introduction de deux gènes codant les protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1, toxiques pour les coléoptères comme *Diabrotica* et d'un gène *pat* conférant à la plante la tolérance à un herbicide, le glufosinate, comme marqueur de sélection.

(C) Informations relatives à la modification génétique

(1) Des embryons immatures de maïs ont été mis en contact avec une souche désarmée d'*Agrobacterium* portant un vecteur de transformation fonctionnant en système binaire (l'ADN-T est sur le vecteur de transformation tandis que les fonctions de virulence permettant son transfert sont codées par un plasmide Ti lui-même dépourvu d'ADN-T).

(3) Considérant que l'ADN-T de 7390 pb porté par le vecteur de transformation PHP17662 comporte les éléments suivants :

- la bordure droite du T-DNA,
- le gène *cry34Ab1* originaire de *Bacillus thuringiensis* souche PS149B1 sous contrôle du promoteur ubiquitine *ubi1ZM* et d'un terminateur d'un gène de pomme de terre,
- le gène *cry35Ab1* originaire de *Bacillus thuringiensis* souche PS149B1 sous contrôle du promoteur du gène de la peroxydase du blé et du même terminateur que précédemment,
- le gène *pat* originaire de *Streptomyces viridochromogenes* sous contrôle des promoteur et terminateur 35S du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur),
- la bordure gauche du T-DNA ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(2) Considérant que les analyses de type Southern (en utilisant une large gamme d'enzymes de restriction et de sondes parfaitement adéquates) et l'analyse des séquences de l'insertion et de ses régions bordures montrent que :

- il y a une insertion unique sans présence d'ADN du vecteur et les séquences introduites ne sont présentes qu'à un seul exemplaire par génome haploïde ;
- l'ADN-T, en comparaison de la construction portée par le plasmide vecteur, présente une délétion de 22 pb du côté de la bordure 5' et 25 pb du côté de la bordure 3', ainsi que 2 mutations ponctuelles dans le promoteur du gène de la peroxydase du blé, une adénine pour une cytosine et une adénine pour une guanine. Ces changements dans une zone non traduite n'affectent pas la composition du cadre de lecture ouverte ;
- les 2593 pb de la région 5' et les 1986 pb de la région 3' de part et d'autre de l'ADN-T inséré sont bien d'origine végétale (maïs) et sont détectables dans la lignée non OGM ; la région 5' présente 2 zones de similitude, l'une de 179 pb et l'autre de 74 pb avec des séquences EST (Expressed Sequence Tag) (sans autre caractérisation) ; la région 3' présente aussi 2 zones de similitude, l'une de 162 pb a une similitude avec l'extrémité 3' non traduite d'une alcool déshydrogénase, et l'autre de 57 pb est similaire à de nombreuses séquences génomiques de maïs ; aucune de ces régions toutefois ne correspond à la séquence codante d'une quelconque protéine connue ;

Considérant que l'analyse informatique des séquences de bordure et du transgène ne montre pas que de nouveaux ORF (cadre de lecture ouverte) auraient ainsi pu être créés et que l'insertion du transgène aurait interrompu un ORF naturel du maïs ;

(3) Informations relatives à l'expression des produits de gène

Considérant que la teneur en protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT a été mesurée par la méthode ELISA dans différents organes (feuille, racine, tige, fourrage, pollen et grain) des plantes prélevés à différents stades de maturité, cultivées au Chili (6 sites en 2002-2003), aux Etats-Unis (3 sites en 2003) et au Canada (2 sites en 2003) et qu'aux Etats-Unis et au Canada les mesures ont été faites sur les plantes génétiquement modifiées traitées et non traitées au glufosinate ;

Considérant que les teneurs moyennes en protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT dans le grain et le fourrage issus de maïs 59122 traité et non traité au glufosinate sont les suivants (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneur moyenne en protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT mesurée dans des plantes non traitées ou traitées au glufosinate d'ammonium exprimée en µg/g de poids sec de tissu (écart-type)

	Grain issu de plante "non traitée" µg/g ps (écart-type)			Grain issu de plante "traitée" µg/g ps (écart-type)		
	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT
Chili (2002-2003)	49,70 (16,2)	0,99 (0,33)	<0,06	-	-	-
USA + Canada (2003)	36,40 (8,9)	2,00 (0,7)	0,10 (0,1)	39,60(8,8)	1,98 (9,8)	0,10 (0,2)
	Fourrage issu de plante "non traitée" µg/g ps (écart-type)			Fourrage issu de plante "traitée" µg/g ps (écart-type)		
	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT	Cry34Ab1	Cry35Ab1	PAT
Chili (2002-2003)	53,10 (19,1)	12,40 (2,77)	<0,06	-	-	-
USA + Canada (2003)	87,70 (9,5)	28,10 (4,2)	2,40 (1,2)	97,10 (17,7)	33,80 (5,9)	2,5 (1,3)

Considérant que les protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 sont détectables dans tous les tissus analysés, que la protéine PAT y est également détectable sauf dans le pollen et ce pour les 3 sites d'expérimentation et que ces trois protéines n'ont été détectées dans aucun des témoins isogéniques non génétiquement modifiés ;

Considérant que des études ont été effectuées par SDS-Page et Western blot pour comparer les protéines détectées dans le maïs 59122 à celles produites dans *Pseudomonas fluorescens* et *E. coli* et que les résultats sont identiques : une seule bande à 14 kDa pour la protéine Cry34Ab1 et deux bandes à 44 kDa et 40 kDa pour Cry35Ab1, également détectées dans *Bacillus thuringiensis* ;

Considérant que l'analyse informatique des séquences des trois protéines n'a pas mis en évidence de protéines de fusion ;

(5) **Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de la plante**

Considérant que l'analyse par ELISA et PCR de plantes jusqu'à la 4^{ème} génération montre que les transgènes sont co-transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant, et que la structure de l'ADN-T, telle qu'analysée par Southern dans des plantes de 4^{ème} génération, s'avère inchangée ;

(7) **Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**

- (7.1-3) Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons d'un maïs hybride portant l'événement 59122 (issu de 3 rétro-croisements et d'une autopolinisation) cultivé sur 6 sites au Chili en 2002-2003 (5 répétitions par site), aux Etats-Unis en 2003 sur 3 sites (5 répétitions par site) et au Canada sur 2 sites (5 répétitions par site) traité et non traité au glufosinate et d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique cultivé conjointement avec le maïs hybride 59122, et qu'elle porte sur le grain et sur le fourrage pour un ensemble de paramètres dont notamment : 9 minéraux, 5 vitamines, 18 acides aminés, 5 acides gras, 7 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels potentiels (furfural, acide phytique, inositol, raffinose, acide férulique, acide paracoumarique, inhibiteur de trypsine) ;

Considérant que les résultats montrent qu'on n'observe pas de différence significative dans les teneurs en constituants fourragers ou chimiques pour les différentes parties de la plante, que celle-ci ait été traitée ou non par le glufosinate, y compris pour le grain, notamment pour ce qui concerne la teneur en métabolites secondaires et en facteurs anti-nutritionnels, entre le maïs portant l'événement 59122 et le témoin ; il convient de noter cependant qu'on observe :

- des différences statistiquement significatives sporadiques pour les protéines brutes, les cendres et les hydrates de carbone suivant le type d'analyse, tout site confondu ou par site ;
- une teneur significativement plus élevée en 9 acides aminés (dont 8 indispensables) en faveur du maïs 59122 lors de son expression par rapport à la matière sèche, en toute logique à relier à l'"augmentation" de la teneur en protéines brutes et qui pourrait être considérée comme un avantage sur le plan nutritionnel ;
- des teneurs en calcium et en phosphore significativement plus élevées dans le fourrage comme dans le grain,

mais que les teneurs en constituants fourragers, aussi bien pour le grain que pour le fourrage, restent dans la limite des fourchettes observées dans la littérature ;

Considérant que l'ensemble de ces données conduit à conclure à une équivalence en substance entre maïs grain portant l'évènement 59122 et son témoin, excepté la présence de très faibles quantités de protéines recombinantes ;

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) Considérant que des études de toxicité aiguë ont été réalisées chez la souris par administration orale et qu'à la dose de 2700 mg/kg p.c. pour la protéine Cry34Ab1 et de 1850 mg/kg p.c. pour la protéine Cry35Ab1, on n'observe aucun effet néfaste chez l'animal ; les deux protéines sont produites par *Pseudomonas fluorescens* dont l'équivalence à celles extraites de la plante génétiquement modifiée a été vérifiée (voir 7.3) ;

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë visant à évaluer les effets toxiques des deux protéines administrées conjointement par voie orale été réalisée chez la souris et qu'à la dose de 482 mg/kg p.c. pour la protéine Cry34Ab1 (54 %) et de 1520 mg/kg p.c. pour la protéine Cry35Ab1 (37 %), on n'observe aucun effet néfaste chez l'animal ;

Considérant que les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT ont été comparées avec des protéines répertoriées dans les banques de données, connues pour être toxiques, immunotoxiques ou avoir une activité pharmacologique, et qu'elles ne présentent pas d'homologie de structure avec ces protéines ;

Considérant que les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT ont été testées *in vitro* dans un milieu gastrique simulé et qu'elles sont rapidement dégradées (5 à 7 minutes) ;

Considérant que les protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT perdent leur activité lorsqu'elles sont chauffées à 60 °C pendant 30 minutes ;

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours avec des rats des deux sexes (60 rats de chaque sexe) en vue d'étudier l'effet de la consommation de maïs grain 59122 incorporé à hauteur de 35% à la ration alimentaire en comparaison avec un maïs témoin ayant le même fonds génétique et avec un régime type de référence ;

Considérant que la composition chimique du maïs 59122 administré aux animaux a été réalisée et qu'elle est conforme aux résultats de l'analyse de composition présentée ci-dessus (voir 7.1-3) ;

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres biochimiques, hématologiques et urinaires ont été mesurés au cours de l'étude, qu'au sacrifice à 90 jours, des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique de 8 organes (poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur 18 organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant qu'on observe des différences statistiquement significatives sur quelques paramètres hématologiques et biochimiques du sang entre les rats nourris avec du maïs 59122 et les rats témoins ;

Considérant cependant que ces différences, ne s'observent que chez un seul sexe, qu'elles sont généralement dans les limites des variations spontanées de ces paramètres et qu'il n'apparaît pas, par ailleurs, d'événements convergents laissant supposer une polarité toxique particulière ; en conséquence, on peut conclure que le traitement par le maïs 59122 est sans effet toxique chez le rat exposé pendant 90 jours via l'alimentation ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que l'absence de glycosylation des protéines Cry34Ab1, Cry35Ab1 et PAT d'origine microbienne ou extraites de la plante, leur instabilité à la chaleur, leur dégradation rapide *in vitro* en milieu gastrique simulé et la comparaison de la séquence des acides aminés de ces protéines avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ;

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 ;

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée chez le poulet nourri pendant 42 jours avec trois régimes 53 %, 58 % et 70 % (correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition) de maïs 59122 traité au glufosinate, en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique et trois variétés de maïs commercialisées ;

Considérant que le dosage des protéines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 montre qu'elles sont présentes aux taux de 14 et 0,7 µg/g de matière sèche de la ration respectivement, que la protéine PAT n'est pas détectable et que l'analyse de composition du grain de maïs 59122 donné aux animaux confirme l'équivalence en substance démontrée dans l'étude de composition (voir 7.1-3), en particulier en ce qui concerne les acides aminés et 7 mycotoxines ;

Considérant qu'on n'observe aucune différence due aux traitements pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux et qu'à l'issue de l'expérience, on n'observe pas non plus de différences en ce qui concerne les données relatives aux caractéristiques de la carcasse : rendement à l'abattage, qualité de la viande et que le poids moyen des reins ainsi que le gras abdominal ne sont pas modifiés ;

Considérant cependant que l'on observe uniquement chez les femelles une différence statistiquement significative dans le poids du foie (3,43 % du poids vif chez les témoins contre 3,65 % chez les poulets nourris avec le maïs 59122) mais que la différence observée est sans signification biologique car le critère est éminemment variable et les valeurs s'inscrivent à 99 % des données individuelles avec une certitude statistique de 95 % ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à la fois à une équivalence nutritionnelle du maïs grain 59122 porteur des trois gènes avec son témoin non GM, ainsi qu'une absence de toxicité de ce maïs pour le poulet, et partant pour l'homme,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère qu'au regard notamment des données sur l'analyse génétique du transgène, des résultats de composition chimique, de l'étude de toxicité chez l'animal de laboratoire et de l'étude d'alimentarité chez l'animal cible, les produits dérivés des variétés de maïs portant l'événement de transformation 59122 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés.

Pascale BRIAND