



AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché de maïs
génétiquement modifié NK603xT25, développé pour être tolérant à deux herbicides,
pour l'importation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet
OGM, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.**

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le lundi 18 octobre 2010 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis sur le dossier d'autorisation de mise sur le marché de maïs génétiquement modifié NK603xT25, développé pour être tolérant à deux herbicides, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (dossier n°**EFSA-NL-2010-80**).

2. CONTEXTE

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA 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'Anses.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective été réalisée par le Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 16 décembre 2010.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire suit les sections des lignes directrices de l'EFSA relatives aux demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

(A) Information générale

Cette demande est une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés des maïs hybrides comportant les deux événements de transformation NK603 et T25 empilés. Elle ne concerne pas sa mise en culture dans l'Union Européenne.

Le maïs NK603xT25 est un hybride obtenu par croisement d'une lignée de maïs comportant l'événement NK603 et d'une lignée de maïs comportant l'événement T25. Ils sont résistants au glufosinate-ammonium et au glyphosate grâce à la présence dans leur génome des gènes pat et cp4 epsps.

Evaluation des maïs parentaux portant les événements NK603 et T25

Maïs NK603 : ces maïs ont été évalués par l'Afssa en 2003 sur deux dossiers d'autorisation de mise sur le marché, l'un concernant l'importation et l'utilisation en alimentation humaine (saisine 2003-SA-0027) de grains et de produits dérivés au titre du règlement (CE) n° 258/97 et l'autre l'importation et l'utilisation en alimentation animale (saisine 2003-SA-0047) au titre de la directive 2001/18/CE. L'Afssa a rendu, pour chacun de ces dossiers, un avis final en janvier 2004 (saisine 2003-SA-0242) dans lequel elle considérait que la consommation de maïs de la lignée NK 603 ne présentait pas de risque nutritionnel pour l'homme et l'animal.

L'Efsa a depuis émis un avis favorable sur ces deux même dossiers et la Commission européenne a publié deux décisions autorisant la mise sur le marché d'aliments et ingrédients alimentaires issus de la lignée de maïs génétiquement modifié NK603 en tant que nouveaux aliments ou nouveaux ingrédients¹ ou pour l'alimentation animale².

En 2006, une demande d'autorisation de mise sur le marché pour la culture, l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de produits dérivés au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 a été déposée. Cette demande a abouti à un avis favorable de l'Efsa le 27 mai 2009.

Maïs T25 : Les maïs portant l'événement de transformation T25 ont été autorisés en 1998 en alimentation animale au titre de la partie C de la directive 90/220/EEC et en alimentation humaine uniquement pour les produits dérivés (amidon et ses dérivés, huile brute et raffinée, produits de transformation) au titre du règlement (CE) n°258/97.

L'Afssa a évalué cet OGM en 1999 dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché d'hybrides obtenus par croisement de deux lignées génétiquement modifiées T25 et MON810. Après consultation de la commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale, l'Afssa avait demandé des informations complémentaires.

En 2008, un dossier de demande de renouvellement après 10 ans d'autorisation a été déposé au titre du règlement (CE) n°1829/2003 pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés. Ce dossier a été examiné par l'Afssa et a donné lieu à une demande de complément d'information concernant l'évaluation de la toxicité sub-chronique de l'aliment pendant 90 jours chez le rongeur ou concernant le recul d'utilisation de ces maïs depuis 10 ans (saisine 2008-SA-0178).

(C) Informations relatives à la modification génétique

Aucun nouveau fragment d'ADN n'est intégré dans le génome du maïs NK603xT25 par rapport aux lignées utilisées pour son obtention. La description des éléments d'ADN ayant permis l'intégration des événements NK603 et T25 est présentée dans les avis 2003-SA-0027, 2003-SA-0242 et 2008-SA-0178.

Les maïs NK603xT25 ont été obtenus par croisement conventionnel entre deux lignées de maïs comportant chacune une modification génétique. La lignée comportant NK603 est de

¹ Décision de la Commission européenne du 3 mars 2005 (2005/448/CE) autorisant la mise sur le marché d'aliments et ingrédients alimentaires issus de la lignée de maïs GM NK 603 en tant que nouveaux aliments ou nouveaux ingrédients alimentaires, en application du **règlement 258/97/CE** (JOCE 21/06/05).

² Décision de la Commission européenne du 19 juillet 2004 (2004/643/CE) concernant la mise sur le marché, conformément à la **directive 2001/18/CE**, d'un maïs génétiquement modifié (*Zea mays* L. lignée NK603) pour améliorer sa tolérance au glyphosate (JOCE 18.09.04).

fonds génétique LH283 et la lignée comportant T25 est de fonds génétique PSB3274, l'hybride résultant du croisement, objet de la demande, comporte les deux événements de transformation dans un fonds génétique LH283xPSB3274. Le maïs contrôle est l'hybride TXN, le produit du croisement LH283xPSB3274.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(1) Les caractères exprimés par le maïs NK603xT25 sont la somme des caractères apportés par chacun des deux parents soit :

L'expression de la protéine PAT (phosphinothricine acétyltransférase), qui confère le caractère de résistance à l'herbicide glufosinate-ammonium inhibe l'activité de la glutamine synthase. La protéine PAT métabolise le L-glufosinate (forme active de l'herbicide) en N-acétyl-L-glufosinate (NAG) qui n'est pas phytotoxique.

L'expression de deux protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) impliquées dans la tolérance au glyphosate sont codées par des gènes issus d'*Agrobacterium* souche CP4 et sont insensibles au glyphosate, contrairement à la protéine endogène du maïs.

(2) Information sur les séquences insérées

Rappel sur NK603 (avis 2003-SA-0027 et 2003-SA-0242)

La construction est constituée de deux cassettes d'expression contenant deux gènes en tandem permettant l'expression de deux protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P impliquées dans la tolérance au glyphosate. Le premier gène est contrôlé par le promoteur de l'actine de riz et fusionné à la séquence d'un peptide de transit du gène EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*, qui permet le transfert de la protéine dans les chloroplastes. Le second gène est contrôlé par le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et l'intron du gène Hsp70 de maïs, qui permet de stabiliser la transcription. Il est également fusionné au même peptide de transit. L'analyse du génome du maïs NK603 a montré qu'il ne contient qu'une seule insertion contenant les deux cassettes.

Rappel sur T25 (rapport 2008-SA-0178)

La séquence insérée dans le génome du maïs T25 contient pratiquement l'intégralité du vecteur de transformation avec une délétion et une duplication réarrangée.

L'insertion comporte les éléments suivants :

- ✓ la cassette intacte d'expression du gène *pat* (p35S-pat-t35S)
- ✓ une partie de la séquence du gène *bla* (77% de l'extrémité 3' du gène sans l'ATG) fusionnée au promoteur 35S tronqué en 5' (66% du promoteur).

D'autres séquences plasmidiques sont insérées en plus de ces éléments.

Analyse du génome du maïs NK603xT25

L'analyse par la technique du Southern blot du génome du maïs NK603xT25 confirme la présence des deux insertions issues des parents dans son génome.

Description des régions d'insertion des transgènes.

Le maïs NK603xT25 est obtenu par croisement conventionnel, il est donc fortement probable que les régions 5'et 3' bordant les deux insertions soient conservées.

Toutefois, une nouvelle analyse bioinformatique, utilisant des bases de données réactualisées, des séquences obtenues chez les lignées parents a été conduite. Cette analyse confirme que l'insertion de l'événement NK603 n'interrompt pas de phase ouverte de lecture annotée du maïs. Elle précise que l'insertion de l'événement T25 s'est produite dans une région du génome présentant des similarités avec les protéines d'un rétrotransposon « gypsy-like ». Cette région est hautement répétée permettant de faire l'hypothèse que l'éventuelle perte de fonction du gène est sans conséquence. La nouvelle analyse des séquences d'insertion réalisée en 2009 a aussi permis de mettre en évidence une délétion d'ADN génomique de 4pb et de 20pb, respectivement, aux sites d'insertion de NK603 et de T25.

Afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence n'a été créée par l'insertion, une nouvelle analyse des séquences issues des lignées parentales des régions de bordures de l'insert a été réalisée pour rechercher la présence d'ORF (open reading frame) putatives entre deux codons stop dans les 6 cadres de lecture. L'analyse prend également en compte les différents réarrangements présents dans les deux insertions. Au total 23 ORF ont été analysés dans le

génomique de NK603 et 17 dans celui de T25. En raison de la duplication d'une partie du promoteur 35S à l'extrémité de l'insertion de T25, accolé à un fragment du gène *bla*, un nouveau gène a été défini et soumis à l'analyse.

L'ensemble de ces séquences a été comparé aux séquences contenues dans les bases de données répertoriant les toxines et allergènes connus, récemment mises à jour, sans mettre en évidence d'homologie.

(3) Informations relatives aux produits d'expression des transgènes

L'expression des protéines CP4EPSPS et PAT a été mesurée dans le maïs NK603xT25 et chez leurs parents: lignées élites LH283 comportant NK603 et PSB3274 comportant T25.

Les échantillons proviennent d'essais réalisés aux champs sur 5 sites localisés aux Etats-Unis pendant l'année 2008. Les protéines ont été quantifiées par des tests ELISA. Les tissus analysés au cours du cycle de développement sont les feuilles, les racines, la plante entière, le fourrage, le grain et le pollen (tableau 1).

Tableau 1 : concentration en protéines CP4 EPSPS et PAT en µg/g de poids sec dans différents tissus de maïs génétiquement modifiés empilés ou simples.

Maïs	Protéines	Tissu / concentration en µg/g poids sec					
		feuilles	racines	plante entière	fourrage	grains	pollen
NK603xT25	CP4 EPSPS	190	48	160	53	8,1	200
NK603	CP4 EPSPS	180	53	180	50	7,2	180
NK603xT25	PAT	48	23	6,6	4	0,52	<LD
T25	PAT	8,6	3,3	8,2	3,7	0,38	<LD

LD= limite de détection

(5) Informations relatives à la stabilité génétique des inserts et à la stabilité phénotypique de leurs expressions.

La caractérisation des insertions NK603 et T25, dans le génome de NK603xT25, montre qu'elles n'ont pas subi de réarrangement. La stabilité des inserts d'un point de vue génétique chez les parents avait été démontrées (2003-SA-0027, 2003-SA-0242 et 2008-SA-0178). Le maïs NK603xT25 est un hybride dont les graines F2 ne sont pas destinées à être replantées.

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

(7.1) La composition du fourrage et des grains du maïs NK603xT25, traités par les deux herbicides a été comparée à celle de la variété de référence TXN, non traités après culture dans 5 sites de 3 états des USA mais sur une seule saison (2008) contrairement aux lignes directrices de l'Efsa.

Les données obtenues ont été comparées à celles provenant de 19 hybrides commercialisés et cultivés sur les mêmes sites (4 variétés par site). 78 composés ont été examinés dont 9 dans le fourrage et 69 dans les grains. Quinze paramètres ont été exclus car inférieurs à la limite de quantification.

L'analyse de la composition chimique du fourrage a porté sur un ensemble de paramètres proximaux : eau, protéines, lipides, cendres, hydrates de carbones, fibres solubles dans les détergents neutres et acides.

L'analyse de la composition chimique des grains a porté sur la teneur en eau, en protéines, en lipides, en fibres totales, en fibres solubles dans les détergents neutres et acides, en cendres et en hydrates de carbone totaux. Les composés chimiques suivants ont été comparés : 18 acides aminés, 9 acides gras, 8 minéraux, 7 vitamines, 4 facteurs antinutritionnels et

métabolites secondaires potentiels (acides phytique, raffinose, acide férulique et acide paracoumarique).

L'analyse de la composition du fourrage et des grains du maïs NK603xT25 met en évidence quelques légères différences statistiquement significatives avec la variété de référence. Toutes les valeurs restent dans l'intervalle de tolérance défini par les données issues des variétés commerciales. Ces valeurs sont aussi comparées et incluses dans l'intervalle défini par les données de référence des bases de données de l'ILSI (International Life Sciences Institute crop composition database, 2006) et de l'OCDE (OECD 2002).

Au regard de ces résultats, il peut donc être considéré que la composition des maïs NK603xT25 n'est pas différente de celle du témoin contrôle.

(7.4) Analyse comparée des caractères agronomiques

L'analyse des caractères agronomiques et phénotypiques a été réalisée sur des plantes provenant des mêmes essais que précédemment (5 sites aux Etats-Unis en 2008). Quatorze paramètres agronomiques ont été mesurés, ils englobent les principaux stades de développement.

Sur chaque site, le maïs NK603xT25 a été comparé à son témoin (hybride TXN) et aux variétés commerciales co-cultivées. Les maïs n'ont pas été traités par des préparations à base de glyphosate ou de glufosinate-ammonium.

Les résultats obtenus sur les plantes transgéniques ont fait l'objet d'une analyse de variance et de tests statistiques et sont comparés aux lignées commerciales. Les caractères agronomiques comparés ne sont pas différents entre les plantes transgéniques et leurs témoins.

(7.6) Effet du procédé de traitement

Toutes les utilisations et processus de transformation des grains de maïs sont applicables aux grains de maïs NK603xT25.

Bien que les teneurs en protéines CP4 EPSPS et PAT aient été correctement déterminées dans différents tissus de maïs et en particulier dans les grains, on peut regretter l'absence de données relatives aux teneurs en protéines CP4 EPSPS et PAT dans les aliments potentiellement destinés à l'homme.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Des données permettant d'estimer la consommation de produits alimentaires dérivés du maïs NK603xT25 et par conséquent en protéines CP4 EPSPS et PAT chez l'animal et chez l'humain ont été fournies.

Elles permettent de calculer une marge d'exposition sur la base de la dose n'induisant pas de mortalité chez l'animal au cours des études de toxicité par administration unique. Ces données sont à tort présentées comme permettant de définir une NOAEL.

(7.8) Toxicologie

Évaluation de la sécurité des organismes donneurs et des protéines CP4 EPSPS, CP4 EPSPS L214P et PAT

La sécurité des organismes donneurs et des protéines exprimées a déjà été évaluée lors de la demande de mise sur le marché des maïs NK603 et T25 (avis 2003-SA-0047, avis 2003-SA-0242 et 2008-SA-0178).

De plus, de nouvelles recherches d'homologie de séquence de la protéine PAT avec les protéines répertoriées dans les versions actualisées des bases de données (Uniprot-Swissprot 2010, Uniprot-trEMBL2010, PDB 2009, Dad 2009 et GenPept 2010) d'une part et des protéines CP4 EPSPS, CP4 EPSPS L214P avec les protéines répertoriées dans la base de données TOX_2010 d'autre part ont été réalisées. Aucune homologie de séquence avec des protéines toxiques connues n'a été identifiée.

(7.8.4) Etude de toxicité sub-chronique

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été conduite en 2004 à partir des maïs NK603³. L'évaluation de cette étude par l'Afssa avait permis de conclure à l'absence de différences significatives entre les rats traités et les rats témoins.

Cependant, compte tenu de l'absence d'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur le maïs T25, il aurait été nécessaire soit de réaliser une telle étude sur le maïs T25 ou sur l'hybride NK603xT25, soit de fournir l'historique de la sécurité de la consommation du maïs T25 montrant l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine et animale.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité des protéines CP4 EPSPS, CP4 EPSPS L214P et PAT est basée sur les éléments suivants :

- ✓ Absence de risque allergique connue de l'organisme source,
- ✓ Absence d'homologie de séquence avec des allergènes connus, ce qui est démontré par des analyses bioinformatiques récentes. La recherche d'homologie de séquences des protéines avec les séquences contenues dans la base de données d'allergènes a été actualisée.
- ✓ Hydrolyse rapide en milieux gastriques et intestinaux démontrée expérimentalement.

Au regard de ces éléments, l'existence d'un potentiel allergénique de ces deux protéines ne peut pas être suspectée.

Il convient toutefois de noter que ces données ne suffisent pas, pour autant, à 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

Une étude d'alimentarité a été réalisée chez 800 poulets (5 répétitions de 8 parquets mâles et 8 parquets femelles, chaque parquet contient 10 animaux et correspond à un traitement) nourris pendant 42 jours avec deux régimes, un régime de "démarrage", un régime de "croissance/finition" contenant respectivement 60% et 64% de grain de maïs génétiquement modifiés ou de maïs témoin quasi-isogénique (TXN) ou de six variétés commerciales non transgéniques.

Les grains proviennent d'un des sites de l'essai mené aux Etats-Unis en 2008 pour l'analyse de composition. L'analyse comparée de composition chimique (énergie métabolique, teneur en protéine, minéraux, acides aminés) des grains de maïs a été réalisée. La composition des matières premières, ne montre pas de différence significative entre elles. Dix neuf mycotoxines ont été recherchées dans les régimes alimentaires utilisés et ne sont pas détectables.

La composition des 2 régimes alimentaires (démarrage, croissance /finition) est présentée pour chaque maïs utilisé. Ils sont identiques, bien équilibrés et montrent une formulation en accord avec les recommandations internationales pour le poulet en croissance.

Le taux de mortalité des animaux dans l'ensemble des groupes de l'expérimentation est au maximum de 0,83%, au cours de la période 0-7 jours et de 3% au cours de la période 7-42 jours. Pour la période 0-7 jours la mortalité des poulets était respectivement de 0% et 0,83% pour les variétés NK603xT25 et TXN. Pendant la période 7-42 jours, la mortalité était respectivement de 0% et 2% pour les variétés NK603xT25 et TXN.

Les résultats, après analyse statistique (ANOVA), ne montrent pas de différence entre les animaux nourris avec le maïs NK603xT25 et le maïs témoin en ce qui concerne les performances de croissance et de consommation (6 paramètres), les rendements de carcasse

³ Hammond et al, (2004) Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food and Chem. Tox.*, **44**, 1092-1099.

(carcasse entière, tissu adipeux abdominal, muscles pectoraux, cuisses, ailes), l'analyse de la composition de la viande (muscles pectoraux et cuisses).

Sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure que la consommation de grain de maïs NK603xT25 par des poulets en croissance n'induit pas de différence significative sur la croissance et sur les caractéristiques de carcasse avec des poulets ayant reçu du maïs non génétiquement modifié.

5. CONCLUSION

Le maïs NK603xT25 est un hybride qui exprime les protéines CP4 EPSPS et PAT, qui lui confèrent une tolérance aux herbicides glyphosate et glufosinate-ammonium.

Les données évaluées confirment que la structure des insertions présentes chez les deux parents, NK603 et T25, est inchangée chez l'hybride.

Une nouvelle bioanalyse des régions bordant les insertions chez les parents, montre qu'aucune expression de nouveau peptide présentant des homologies avec des toxines ou allergènes connus n'est attendue.

L'analyse de la composition chimique du fourrage et du grain de maïs NK603xT25 montre qu'elle n'est pas différente de celle des témoins.

Cette analyse n'a cependant porté que sur des échantillons provenant de plantes cultivées pendant une seule saison

Il en est de même en ce qui concerne les qualités nutritionnelles de ces maïs qui sont comparables à celles des témoins.

Cependant, compte tenu de l'absence d'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur le maïs T25, il aurait été nécessaire soit de réaliser une telle étude sur le maïs T25 ou sur l'hybride NK603xT25, soit de fournir l'historique de la sécurité de la consommation du maïs T25 montrant l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine et animale. Par conséquent, l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire des maïs NK603xT25 et de leurs produits dérivés.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : OGM, maïs NK603, maïs T25, résistance au glyphosate et au glufosinate-ammonium.