

Maisons-Alfort, le 14 mai 2004

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs  
hybride NK 603 x MON 810 résultant du croisement conventionnel des lignées  
parentales issues de deux maïs portant l'un l'évènement de transformation  
NK 603, l'autre l'évènement de transformation MON 810  
en vue de son importation et de son utilisation, à l'exclusion de la culture,  
au titre de la directive 2001/18/CE**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 21 avril 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 maïs hybride NK 603 x MON 810 résultant du croisement conventionnel des lignées parentales issues de deux maïs portant, l'un l'évènement de transformation NK 603, l'autre l'évènement de transformation MON 810 en vue de son importation et de son utilisation, à l'exclusion de la culture, au titre de la directive 2001/18/CE (dossier n°C/GB/02/M3/3 déposé auprès des autorités britanniques).

**CONTEXTE**

Le maïs portant l'évènement de transformation NK 603 a été examiné par le Comité "Biotechnologie" de l'Afssa en mars 2003 et en novembre 2003 et par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) en novembre 2003 et la consommation de maïs NK 603 a été considérée comme ne présentant pas de risque pour la santé du consommateur et des animaux.

Des variétés de maïs génétiquement modifié portant l'évènement de transformation MON 810 sont autorisées en Europe par décision de la Commission 98/294/CE du 22 avril 1998 et en France par arrêté du 5 août 1998.

La demande, objet du présent avis, porte sur un maïs hybride issu du croisement conventionnel entre la lignée NK 603 rendue tolérante au glyphosate par introduction de deux gènes *CP4 EPSPS* et *CP4 EPSPS L214P* et la lignée MON 810 rendue résistante à des insectes par l'introduction du gène *Cry1Ab*.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 13 mai 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

**INFORMATIONS RELATIVES AUX DEUX MODIFICATIONS GENETIQUES ET A L'HYBRIDE*****Evénement NK 603***

Considérant que la construction introduite par biolistique est constituée de deux gènes *CP4 EPSPS* et *CP4 EPSPS L214P* en tandem permettant l'expression de deux protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P impliquées dans la tolérance au glyphosate et que le premier gène est contrôlé par le promoteur de l'actine de riz, le second par le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, et que dans le génome du maïs, il y a une seule insertion et cette insertion contient une seule construction (vérification par Southern) ;

Considérant que deux changements de nucléotides sont observés dans le second gène, présents dès la transformation initiale, que le premier de ces nucléotides correspond à une mutation silencieuse et que le second entraîne la substitution d'un acide aminé en position 214 : la leucine est remplacée par une proline ;

Considérant que la construction finale ne comprend pas de gène de résistance à un antibiotique (vérification faite) ;

Considérant que :

- les éléments bordures de l'insertion ont été analysés (307 bp (paires de bases) en 5' amont et 497 bp en 3' aval) et que 3 bp ont disparues du génome du maïs lors de l'insertion ;
- du côté de l'extrémité 3' de la partie du génome où s'est faite l'insertion, et du côté de l'extrémité 5', toutes les séquences comprises entre deux codons stop ont été analysées selon les différents cadres de lecture possibles ;
- ces bioanalyses indiquent que des peptides pourraient être traduits (dans l'hypothèse, peu probable, où les zones promotrices soient fonctionnelles) ;
- les séquences comprises entre deux codons stop sont susceptibles de coder
  - (i) du côté de l'extrémité 3', un peptide d'environ 70 acides aminés de 5' vers 3' et deux peptides d'environ 30 et 125 acides aminés de 3' vers 5', et
  - (ii) du côté 5', des peptides d'environ 17 à 74 acides aminés de 3' vers 5' ;
- la comparaison de ces séquences peptidiques avec les bases de données des protéines toxiques ou allergiques ne montre pas de similitude ou d'identité avec de telles protéines ;

Considérant cependant qu'il n'y a pas d'information indiquant si la séquence en amont (307 bp) et en aval (497 bp) de l'insertion correspond ou non à une séquence transcrite comme étant une seule séquence telle qu'elle existe dans le maïs non transgénique, pour vérifier quel est le produit de traduction au niveau du point d'insertion du transgène dans le génome du maïs ;

Considérant que l'intégrité de la construction introduite a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante au cours de 5 générations ;

#### **Événement MON 810**

Considérant que la lignée MON 810 est porteuse du gène tronqué *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* codant une protéine "toxique" spécifique de certains lépidoptères notamment *Ostrinia nubilalis* et *Sesamia* spp. ;

Considérant

- les éléments bordures de l'insertion ont été analysés (244 bp) en 5' amont et 606 bp en 3' aval ;
- l'analyse de la séquence du côté de l'extrémité 3' de l'insertion permet d'identifier un fragment homologue à l'ADN mitochondrial codant pour la protéine ribosomique S13 ;
- les séquences des peptides putatifs déduits de 6 ORF (open reading frame) potentiels ont été comparées avec les séquences d'allergènes connus et répertoriés dans les bases de données et qu'aucune de ces séquences putatives ne présente d'homologies avec celles d'allergène ;
- l'analyse de la séquence du côté 5' de l'insertion semble montrer que l'insertion s'est faite dans un gène codant une alpha zéine du maïs ; ceci ne devrait pas induire de perturbations métaboliques majeures en raison de la redondance des gènes de zéine dans le génome ;

Considérant que l'intégrité de la construction introduite a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante sur plusieurs générations ;

#### **Hybride NK603 x MON 810**

Considérant que l'hybride résulte d'un croisement conventionnel des deux lignées de maïs, NK 603 et MON 810, que son génome contient deux inserts localisés sur des chromosomes différents, l'un correspond aux gènes *CP4 EPSPS* et *CP4 EPSPS L214P*, l'autre au gène tronqué *Cry1Ab* et que ce croisement n'a pas altéré la fonctionnalité des inserts ;

#### **INFORMATIONS RELATIVES A L'EXPRESSION DES PROTÉINES DANS LE GRAIN ET LA PLANTE**

Considérant que le dosage quantitatif des protéines exprimées a été réalisé dans le grain et le fourrage (plantes cultivées en 2000 sur trois sites expérimentaux français) ;

Considérant que les teneurs en protéines dans le témoin non génétiquement modifié, les lignées NK 603 et MON 810, et l'hybride NK 603 x MON 810 sont les suivantes :

Maïs	Teneur en protéine Cry 1A(b) (résistance aux insectes) (µg/g de poids frais)		Teneur en protéine CP4 EPSPS (tolérance au glyphosate) (µg/g de poids frais)	
	Fourrage	Grain	Fourrage	Grain
Témoin (non GM)	< 0,27 (LD <sup>(1)</sup> )	< 0,13 (LD)	< 0,38 (LD)	< 0,08 (LD)
NK 603 (glyphosate)	< 0,27 (LD)	< 0,13 (LD)	<b>37,2</b> (8,5-78)	<b>13,4</b> (1,2-18)
MON 810 (Cry1Ab)	<b>6,40</b> (2-9,9)	<b>0,72</b> (0,4-1,1)	< 0,38 (LD)	< 0,08 (LD)
NK 603 x MON 810	<b>6,06</b> (2,8-8,8)	<b>0,73</b> (0,5-1,0)	<b>36,3</b> (12,6-61,4)	<b>12,7</b> (2-21,9)

<sup>(1)</sup> : Limite de détection

Considérant que la protéine Cry1A(b) se stocke dans le cytoplasme tandis que la protéine CP4 EPSPS se stocke dans les chloroplastes ;

Considérant que ces données indiquent clairement que l'hybride "hérite" quantitativement, notamment dans le cas du fourrage, de la haute teneur en Cry1A(b) de son parent MON 810 et de la haute teneur en CP4 EPSPS de son parent NK 603 ;

#### INFORMATIONS RELATIVES A LA COMPOSITION CHIMIQUE ET A LA QUALITE NUTRITIONNELLE DU GRAIN

Considérant que les analyses de composition de l'hybride NK 603 x MON 810 comparées à celles d'une variété similaire non transgénique ont porté sur le grain et le fourrage issus de plantes cultivées sur trois sites en France en 2000 ; pour le grain, 52 composants ont été analysés dont : humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, ADF<sup>1</sup>, NDF<sup>2</sup>, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, acide phytique et facteurs anti-trypsique, métabolites secondaires (acide férulique, inositol, raffinose et acide pcoumarique) et pour le fourrage, 7 composants dont : humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, ADF NDF ;

Considérant que les résultats disponibles font apparaître 56 différences statistiquement significatives (à  $p < 0,05$ ) sur 236 comparaisons site par site, que ces différences se limitent à 14 lorsque l'analyse porte sur tous sites confondus mais qu'elles ne reflètent pas une signification biologique précise car comprises dans la gamme de variation que l'on observe systématiquement lorsque les géotypes sont cultivés dans des endroits différents et d'une année sur l'autre ;

Considérant que, bien que restant dans la fourchette des teneurs observées dans les tables, une valeur significativement plus faible en arginine, histidine et cystine et une teneur supérieure en phénylalanine et en leucine du grain de l'hybride par rapport au témoin dans l'analyse globale effectuée sur trois sites mériteraient d'être vérifiées par des analyses portant sur au moins une deuxième année de récolte afin de s'assurer de l'équivalence de composition en acides aminés de l'hybride par rapport aux témoins ;

#### ETUDE DE TOLERANCE ET DE TOXICITE SUBCHRONIQUE CHEZ LE RAT

##### **Lignées NK 603 et MON 810**

Considérant que les maïs NK 603 et MON 810 ont chacun fait l'objet d'une étude sur le rat nourri pendant 90 jours avec du grain de ces deux maïs et qu'aucune différence ayant une signification biologique n'a été observée (cf avis de l'Afssa du 7 mars 2003 et 5 janvier 2004 pour le maïs NK 603 et avis du 20 juin et 6 novembre 2003 pour le maïs MON 810) ;

##### **Hybride NK 603 x MON 810**

Considérant que l'hybride NK 603 x MON 810 n'a volontairement pas été testé pendant 90 jours chez le rat, le pétitionnaire estimant que les deux essais de toxicité sub-chronique sur chacun des maïs parents sont suffisants pour démontrer l'innocuité des produits de l'hybride ;

<sup>1</sup> ADF : résidu après traitement par un détergent acide

<sup>2</sup> NDF : teneur en paroi cellulaire estimée par le résidu obtenu à la suite d'un traitement contenant un détergent neutre

**ETUDE DE TOLERANCE ET D'ALIMENTARITE CHEZ LEPOULET**

***Lignées NK 603 et MON 810***

Considérant que les maïs NK 603 et MON 810 ont chacun fait l'objet d'une étude sur le poulet nourri pendant 42 jours avec du grain de ces deux maïs et qu'aucune différence ayant une signification biologique n'a été observée (cf avis de l'Afssa du 7 mars 2003 et 5 janvier 2004 pour le maïs NK 603 et avis du 20 juin et 6 novembre 2003 pour le maïs MON 810) ;

***Hybride NK 603 x MON 810***

Considérant qu'un essai d'alimentarité<sup>3</sup> a été réalisé sur des poulets nourris pendant 42 jours avec du maïs hybride NK 603 x MON 810 et que 8 paramètres zootechniques et 13 paramètres mesurés sur la carcasse des animaux abattus à l'issue de l'expérimentation ;

Considérant que les données relatives à ces paramètres ont été comparées à celles obtenues chez des poulets nourris d'une part avec du maïs NK 603, son témoin isogénique et 5 variétés commerciales (expérimentation 1), d'autre part avec du maïs isogénique (à l'hybride NK 603 x MON 810) et 5 variétés commerciales (expérimentation 2) ;

Considérant que, bien qu'une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de la teneur en protéines du muscle pectoral chez les animaux recevant le maïs hybride NK 603 x MON 810 soit observée, l'analyse statistique de toutes les autres données ne montre pas de différences entre l'hybride NK 603 x MON 810 et l'ensemble des témoins, permettant de considérer que le maïs hybride présente une équivalence nutritionnelle par rapport aux maïs témoins,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que :

- afin de vérifier que les différences observées concernant les teneurs en certains acides aminés ne sont pas liées à l'hybride NK 603 x MON 810 et pouvoir affirmer l'équivalence en substance fondée dans le présent dossier sur les données analytiques provenant d'une seule récolte, il conviendrait de disposer :
  - des analyses de composition sur au moins deux années de culture (cf lignes directrices de l'AESA<sup>4</sup>) ;
  - d'une analyse statistique, pour les variétés commerciales, des variations concomitantes de teneurs en arginine, cystine, histidine, leucine et phénylalanine dont les valeurs sont significativement différentes chez l'hybride par rapport au témoin ;
- la conclusion du pétitionnaire, qui considère l'innocuité de l'hybride NK 603 x MON 810 démontrée par les études sur chacun des parents, ne peut être retenue. Afin de vérifier l'absence d'effets néfastes ou toxiques de l'hybride, il conviendrait de réaliser une étude toxicité subchronique de 90 jours chez le rat nourri avec l'hybride traité & non traité au glyphosate.

En l'absence des informations indiquées ci-dessus, un avis concernant la sécurité sanitaire de la consommation du maïs hybride NK 603 x MON 810 et de ses dérivés ne peut être rendu.

**Martin HIRSCH**

<sup>3</sup> Cette étude a été publiée en 2003 dans Poultry Science, 82:443-453

<sup>4</sup> Draft guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA, April 2004, paragraph 7.2