

Maisons-Alfort, le 22 juin 2006

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 GA21 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 19 avril 2006 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 GA21 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-2005-19).

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'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 15 juin 2006, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) **Information générale**

L'évènement de transformation GA21 a déjà fait l'objet d'une évaluation par les comités d'experts de l'Afssa pour l'alimentation animale en 1999/2000 dans le cadre d'un dossier déposé au titre de la directive 90/220/CE et d'une évaluation pour l'alimentation humaine dans le cadre d'un dossier déposé au titre du règlement (CE) n° 258/97. Dans ces avis, il était conclu que "les données fournies démontraient l'innocuité de la protéine mEPSPS et l'absence d'effets indésirables sur la valeur nutritionnelle de la lignée GA21 mais que, néanmoins, un essai de toxicité 90 jours de la protéine mEPSPS devrait être réalisé pour confirmer l'absence de toxicité de la protéine modifiée."

Par Décision 2006/69/CE du 13 janvier 2006 (JOCE 07/02/06) la Commission européenne a autorisé la mise sur le marché d'aliments et ingrédients produits à partir de la lignée de maïs génétiquement modifié GA21 au titre du règlement 258/97/CE pour l'alimentation humaine.

Le présent dossier porte sur une demande d'élargissement de l'autorisation de mise sur le marché d'aliments et ingrédients produits à partir de maïs GA21 aux grains et produits dérivés pour l'alimentation humaine et animale.

Le maïs GA21 a été modifié par l'introduction dans le génome nucléaire d'un gène muté codant une enzyme modifiée, la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (mEPSPS) tolérante au glyphosate. Les EPSPS présentes dans les plantes et les bactéries sont en général inhibées par le glyphosate, cette inhibition entraînant l'arrêt de la synthèse des acides aminés aromatiques et, par là, la mort de la plante ou de la bactérie. La présence d'une EPSPS supplémentaire dans les chloroplastes, rendue

insensible au glyphosate par la modification de deux acides aminés en position 102 (Thr→Ile) et en position 106 (Pro→Ser), permet le maintien de la synthèse d'acides aminés et donc la survie de la plante lorsqu'elle est soumise à un traitement par l'herbicide.

(C) Informations relatives à la modification génétique

- (1) L'événement GA21 a été obtenu par une méthode de biolistique qui consiste à bombardier une suspension cellulaire de maïs par des microparticules sur lesquelles a été fixée la construction génétique (ADN-T).
- (3) Considérant que l'ADN-T porté par le vecteur de transformation pDPG434 sur le fragment de restriction *Not1* comporte les éléments suivants :
- un gène promoteur de l'actine de riz (1400 pb),
 - la séquence codant le peptide de transit optimisé (400 pb)
 - le gène muté *mepsps* (1300 pb)
 - un gène terminateur *Nos* (300 pb) ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que l'analyse des séquences du fragment inséré montre que l'insertion comprend 6 régions/copies consécutives dérivées du fragment *Not1* de 3400 pb obtenu du plasmide pDPG434 utilisé pour la transformation pour générer l'événement GA21 :
- la copie 1 (2752 pb) constituée du promoteur de l'actine de riz délété de 696 pb, du premier exon/intron de l'actine, de la séquence du peptide de transit optimisé, de la partie codante du gène *mepsps* et du terminateur *Nos* ;
 - les copies 2, 3 et 4, correspondant chacune à une version intacte du fragment *Not1* de pDPG434 (3492 pb chacune) ;
 - la copie 5 (2153 pb) contenant une séquence complète du promoteur de l'actine, du premier exon/intron de l'actine, de la séquence du peptide de transit optimisé et des 288 premières pb du gène *mepsps* qui se termine par un codon stop et qui ne contient donc pas le terminateur *Nos* ;
 - la copie 6 (955 pb) contenant le promoteur de l'actine de riz et une partie tronquée du premier exon. Il ne contient aucun autre élément du plasmide pDPG434 ;

Considérant que les analyses de type Southern ne mettent pas en évidence la présence d'autres copies de la construction ailleurs dans le génome, ni d'éléments appartenant au plasmide pDPG434, notamment les gènes *bla* et *lac* ;

Considérant que des analyses de type Northern et western, réalisées pour rechercher des produits de transcription et de traduction des copies du gène tronqué *mepsps*, ne mettent pas en évidence la présence d'ARN ou de protéines tronquées ;

Considérant que la séquence des régions de jonction 3' et 5' de part et d'autre de l'insertion a été réalisée en même temps que l'insertion, correspondant à un fragment total de 20 500 pb ;

Considérant que, du côté 5' :

- la comparaison de la séquence des 1000 premières pb de la région bordure avec les séquences figurant dans les bases de données montre des homologies avec de l'ADN chloroplastique (la présence de telles séquences au sein du génome nucléaire a déjà été observée même dans des plantes non transgéniques y compris le maïs) ;
- la recherche de nouveaux cadres de lecture ouverte (ORF) (présence d'un codon ATG et d'au moins un codon stop et une séquence codante correspondant à au moins 50 acides aminés) dans la zone de jonction en 5' entre l'ADN inséré et l'ADN de la plante a mis en évidence la présence de deux ORF potentielles : l'ORF 3 (303 pb/101 aa) et l'ORF 4 (489 pb/163 aa). L'ORF 4 présente une homologie avec les 17 premiers acides aminés de la protéine impliquée dans la synthèse du cytochrome C, codée par un gène habituellement trouvé dans le génome chloroplastique du maïs. On peut faire l'hypothèse que si l'insert a interrompu un gène nucléaire impliqué dans la biosynthèse du cyt C, le gène fonctionnel impliqué existant au sein du génome

chloroplastique compenserait la version tronquée de ce gène dans le génome nucléaire ;

- la comparaison des séquences des ORF potentielles avec celles de protéines toxiques ou allergènes connues n'a pas mis en évidence d'homologies avec de telles protéines ;

Considérant que, du côté 3' :

- la comparaison de la séquence des 990 premières pb de la région bordure avec les séquences figurant dans les bases de données montre des homologies avec des séquences répétées du maïs ;
- la recherche de nouveaux cadres de lecture ouverte (ORF) a mis en évidence la présence de deux ORF potentielles situés dans le génome de la plante à l'extrémité 3' (ORF 1 : 294 pb/98 aa et ORF 2 : 324 pb/108 aa) ; la comparaison de ces séquences avec celles de protéines toxiques ou allergènes connues n'a pas mis en évidence d'homologies avec de telles protéines ;

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

Considérant que la teneur en protéine mEPSPS a été mesurée par la méthode ELISA dans différents tissus (feuille, racine, plante entière, pollen et grain), prélevés à différents stades de maturité (anthèse, maturité, sénescence), de deux maïs hybrides portant l'événement GA21, traités au glyphosate, et cultivés en 2004 aux Etats-Unis ;

Considérant que la teneur en protéine EPSPS dans les plantes non génétiquement modifiées est inférieure à la limite de détection et que les teneurs moyennes en protéine mEPSPS dans les différents tissus et selon le stade de développement de la plante sont les suivantes (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéine mEPSPS mesurées dans des plantes traitées au glyphosate, exprimées en µg/g de poids frais de tissu (limite de détection : 0,05 à 0,5 selon les tissus)

Stade	Anthèse	Maturité	Sénescence
Feuilles	13-15	0,3 - 0,5	0,24
Racines	6-7	3 - 3,6	-
Grain	-	6,6 - 7 ⁽¹⁾	4 - 4,7
Pollen	158 - 178	-	-
Plante entière	7,7 - 9,6	3,4 - 5,3	5 - 5,2

⁽¹⁾: 9,5 à 10 µg/g de poids sec

Considérant donc que la protéine mEPSPS est détectable dans tous les tissus analysés, que la teneur maximale est mesurée dans le pollen puis dans les feuilles au stade anthèse et que les teneurs sont similaires pour les deux hybrides GA21 ;

(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 3^{ème} génération montre que les transgènes sont co-transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant, et que la structure de l'ADN inséré, telle qu'analysée par Southern dans des plantes de 3^{ème} génération, s'avère inchangée ;

Considérant que la stabilité phénotypique a été vérifiée : le dosage de la protéine mEPSPS dans les grains et les feuilles de plantes cultivées en serre issues de 3 rétrocroisements montre le maintien de l'expression de la protéine mEPSPS à un niveau égal au cours des générations ;

(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 GA21 cultivé sur 6 sites aux Etats-Unis en 2003-2004 (3 répétitions par site), traité au glyphosate ou par des herbicides conventionnels et d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique cultivé conjointement avec le maïs hybride GA21, et qu'elle porte sur le grain et/ou sur la plante entière pour un ensemble de paramètres dont notamment : 7 constituants fourragers dont l'amidon, 9 minéraux dont le sélénium, 6 vitamines, 18 acides aminés, 5 acides gras, 7 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels potentiels (furfural, acide phytique, inositol, raffinose, acide férulique, acide para-coumarique, inhibiteur de trypsine) ;

Considérant que l'analyse des différents paramètres, fondée sur une étude statistique rigoureuse et complétée par une analyse des interactions site x traitement, montre qu'on observe des différences sporadiques sans signification biologique dans les teneurs en constituants fourragers ou chimiques (cendre, matière grasse et NDF), que les plantes aient été traitées au glyphosate ou par des herbicides conventionnels ; aucune différence n'est observée pour ce qui concerne la teneur en métabolites secondaires et en facteurs anti-nutritionnels, entre le maïs portant l'événement GA21 et le maïs témoin ; la seule différence observée concerne le bêta-carotène dont la teneur est plus élevée dans le maïs GA21 traité au glyphosate ou par des herbicides conventionnels que dans le maïs témoin, ces teneurs restant cependant dans les fourchettes des valeurs de la littérature ;

Considérant que l'ensemble de ces données conduit à conclure à une équivalence en substance entre le maïs grain portant l'événement GA21 et son témoin, excepté la présence de très faibles quantités de protéines recombinantes, et à l'absence d'effet du traitement par le glyphosate sur la composition chimique des grains et de la plante entière ;

Considérant qu'une précédente étude de composition réalisée sur des plantes cultivées aux Etats-Unis en 1996 sur 5 sites (non traitées au glyphosate), aux Etats-Unis en 1997 sur 6 sites (traitées au glyphosate) et en Europe en 1997 sur 4 sites (traitées au glyphosate) avait permis d'estimer que le maïs GA21 présentait une équivalence substantielle au maïs témoin ;

(7.4) **Caractères agronomiques**

Considérant que les caractères agronomiques de plantes GA21 (deux lignées commerciales), cultivées sur 8 sites aux Etats-Unis en 2004 et sur 3 sites au Brésil (2003/2004) ont été comparés à ceux de plantes témoins à partir de vingt paramètres et qu'il n'est pas observé de différences entre les plantes génétiquement modifiées et les plantes témoins en termes de rendement, d'efficacité, de sélectivité et de sensibilité à des champignons parasites, *Helminthosporium* et *Cercospora* ;

(7.5) **Spécificité**

Considérant que les caractéristiques physico-chimiques de la protéine mEPSPS extraite du maïs GA21 et celle d'origine microbienne ont été comparées et montrent que ces données ne mettent pas en évidence de différences en terme de poids moléculaire et de séquence N terminale ; la pureté de la protéine extraite d'*E.coli* a été vérifiée ;

(7.6) **Effets des traitements technologiques**

Considérant que les teneurs en mEPSPS sont inférieures à la limite de détection dans l'amidon, l'huile, les flocons et les tortillas (173 °C), le gluten feed, les sons de maïs, le tourteau de germes et les eaux de trempage, et que les teneurs sont comprises entre 3,6 à 10 µg/g de poids frais dans la farine et les gruaux de maïs ;

(7.8) **Toxicologie**

Considérant que la protéine mEPSPS a déjà fait l'objet :

- d'une étude de toxicologie aiguë chez la souris, selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales, et qu'aucun effet toxique aigu n'a été observé à 2000 mg/kg p.c. ;
- de tests de digestion protéolytique *in vitro* et que cette protéine est rapidement dégradée ;
- de mesures de l'activité enzymatique qui disparaît après 30 minutes à 65 °C ;
- de comparaison de séquences avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques et qu'aucune homologie de séquence n'a été retrouvée avec ces peptides ;

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique (90 jours) a été réalisée en novembre 2004, selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales, avec des rats des deux sexes (72 rats de chaque sexe, 12 animaux par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation du maïs grain GA21, traité au glyphosate ou avec des herbicides conventionnels, incorporé à hauteur de 10% ou de 41,5% à la ration alimentaire en comparaison avec un maïs témoin ayant le même fonds génétique ;

Considérant que la composition chimique du maïs GA21 administré aux animaux a été déterminée 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 11 organes (+ poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur les organes (n=48) ont été effectués ;

Considérant que l'on observe ponctuellement des différences statistiquement significatives sur quelques paramètres cliniques ou fonctionnels, tels que le poids corporel ou l'efficacité alimentaire, le sens des variations étant toutefois inversé selon le sexe, ou sur des paramètres hématologiques et biochimiques sanguins ainsi que sur le poids de quelques organes entre les rats nourris avec du maïs GA 21 et les rats témoins ;

Considérant cependant que ces différences ne s'observent pas de façon identique selon le sexe et tantôt chez les animaux nourris avec du maïs traité au glyphosate, tantôt chez animaux nourris avec du maïs traité avec les herbicides conventionnels, qu'il n'apparaît pas de relation entre la "dose" et les effets, que ces variations s'inscrivent dans les limites spontanées des paramètres chez cette espèce et qu'il n'apparaît pas, par ailleurs, d'événements convergents laissant supposer une polarité toxique particulière, avis étayé par l'absence d'altération macroscopique ou microscopique des organes examinés ; en conséquence, on peut conclure que le traitement par le maïs GA 21 est sans effet toxique chez le rat exposé pendant 90 jours via l'alimentation ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que l'absence de glycosylation de la protéine mEPSPS d'origine microbienne ou extraite de la plante, son instabilité à la chaleur, sa 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 (600 mâles et 600 femelles, 6 répétitions par traitement et par sexe) nourri pendant 49 jours avec trois

régimes (correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition) à base de maïs GA21 traité au glyphosate ou avec des herbicides conventionnels, en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique et du maïs commercialisé, cultivés en 2004 aux Etats-Unis ;

Considérant que l'équivalence nutritionnelle et les teneurs en mycotoxines des rations entre les maïs GA21 et les maïs témoins ont été vérifiées et que le dosage de la protéine mEPSPS montre qu'elle est présente à des teneurs comprises entre 1 à 2,5 µg/g de poids frais de la ration et qu'elle n'a pas été détectée dans les maïs témoins ;

Considérant que :

- on n'observe aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le maïs GA21 (traité au glyphosate ou avec des herbicides conventionnels) et le maïs témoin pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux ;
- 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) ; le poids moyen des reins ainsi que le gras abdominal ne sont pas modifiés ;
- en revanche, les animaux nourris avec le maïs commercial présentent de moins bonnes performances de croissance que les animaux nourris avec le maïs GA21 ou le maïs témoin ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs grain GA21 avec son témoin non génétiquement modifié, ainsi qu'à une absence de toxicité de ce maïs pour le poulet, le traitement de la plante par le glyphosate n'induisant pas de différence sur l'ensemble des paramètres mesurés ;

Considérant que par ailleurs de nombreuses publications, publiées dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture, rapportant les résultats d'études sur la vache laitière, le porc, le taurillon et le poulet nourris avec différentes variétés de maïs portant l'événement de transformation GA21 concluent également à l'équivalence nutritionnelle de ce maïs par rapport à un maïs témoin ou conventionnel,

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 GA21 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les maïs conventionnels et leurs produits dérivés pour l'alimentation humaine et animale.

Par ailleurs, les résultats des études figurant dans le présent dossier permettent de lever les réserves émises par l'Afssa dans ses avis de décembre 1999, janvier et avril 2000.

Pascale BRIAND