

Maisons-Alfort, le 5 juin 2007

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 LY038 x MON 810 résistant à des insectes et
dont la teneur en lysine a été modifiée pour l'importation et l'utilisation en
alimentation humaine et animale de grains et 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 28 février 2007 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 LY038 x MON 810 résistant à des insectes et dont la teneur en lysine a été modifiée, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA/NL/2006/32).

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) 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 24 mai 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) **Information générale**

Cette demande d'autorisation de mise sur le marché concerne un maïs hybride génétiquement modifié LY038 x MON 810 obtenu par croisement conventionnel de deux lignées, l'une modifiée pour présenter des teneurs en lysine augmentées et l'autre la résistance à certains lépidoptères (*Ostrinia nubilalis* et *Sesamia* spp).

La teneur en lysine est le facteur limitant primaire par rapport au besoin nutritionnel des animaux monogastriques en acides aminés. La supplémentation en lysine des aliments des porcs et des volailles, voire même des vaches laitières, est une pratique courante en production animale en Europe pour équilibrer son apport dans la ration alimentaire. Disponible sous forme de chlorhydrate ou de sulfate, la lysine apportée en supplémentation provient d'une synthèse par fermentation microbienne d'un substrat approprié par *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*), bactérie commune du sol la plus utilisée pour la production commerciale de lysine.

Les maïs génétiquement modifiés LY038 x MON 810 sont destinés à la consommation animale. Mais, afin de prendre en compte la présence fortuite éventuelle de ces maïs dans l'alimentation humaine, la demande porte également sur le grain et ses produits dérivés pour la consommation humaine. Elle ne concerne pas la mise en culture des maïs LY038 x MON 810 dans l'Union européenne.

Le maïs LY038 a fait l'objet d'un avis de l'Afssa le 5 juin 2007 qui reprend en détail, notamment, l'ensemble des éléments relatifs à la modification génétique introduite. Le maïs MON 810 est autorisé à la culture et à la consommation humaine et animale depuis 1998 (décision de la Commission du 22 avril 1998).

(C) **Informations relatives à la modification génétique**

Considérant que le maïs LY038 x MON 810 provient du croisement conventionnel entre une lignée homozygote pour LY038 et une lignée homozygote pour MON 810 (annexe) ;

Lignée LY038

Considérant que le maïs LY038 provient du croisement conventionnel entre un maïs portant les gènes *cordapA* et *nptII* et un maïs portant les gènes *nptII* et *cre* ;

Parent de LY038 portant les gènes *nptII* et *cordapA*

Un 1^{er} maïs a été obtenu par transformation par biolistique de cals issus de la lignée H99 de maïs avec de l'ADN purifié constitué d'un fragment XhoI de 5,9 kb, isolé à partir du plasmide PV-ZMPQ76 de 8,8 kb. Le fragment XhoI est constitué des séquences fonctionnelles suivantes (en dehors des très courtes séquences synthétiques ayant permis la liaison des différents éléments lors de sa construction) :

- le promoteur du gène *Glb1* codant une globuline spécifique de l'embryon chez le maïs ;
- l'intron du gène d'actine *rAct1* du riz ;
- la séquence mDHDPS CTP codant le peptide d'adressage au chloroplaste de la dihydrodipicolinate synthétase (DHDPS) de maïs ;
- la séquence *cordapA* codant la cDHDPS de *Corynebacterium glutamicum*, enzyme insensible à la rétro-inhibition par la lysine ;
- la région 3' transcrite non traduite assurant la fin de transcription du gène de globuline *Glb1* du maïs (*Glb1* 3' UTR) ;
- un site *lox* issu du bactériophage P1 cible de sa recombinase CRE ;
- le promoteur initiant la transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (p CaMV 35S), à expression quasi constitutive dans les cellules végétales ;
- la séquence *nptII* codant la néomycine phosphotransférase issue du transposon Tn5 isolé du colibacille ;
- la séquence suivant le gène *nptII* sur le transposon Tn5, composée d'une partie (153 pb¹ sur 378) du gène *Ble* codant la bléomycine phosphotransférase ;
- le site de terminaison de transcription du gène *nos* codant la nopaline synthétase dans le T-DNA issu d'une souche à nopaline d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- un site *lox* issu du bactériophage P1 cible de sa recombinase CRE.

Parent de LY038 portant les gènes *nptII* et *cre*

Le 2^{ème} maïs a été obtenu par transformation par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide PV-ZM003. L'ADN-T est constitué comme suit :

- le promoteur du gène actine 1 du riz ;
- le premier intron du même gène actine 1 du riz ;
- la séquence du gène *rec3* du coliphage P1 codant la recombinase site-spécifique CRE ;
- la séquence comportant les signaux de terminaison de transcription et de polyadénylation issue du gène de la nopaline synthétase du T-DNA d'un pTi d'*A. tumefaciens* ;
- le promoteur de transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ainsi que sa région "enhancer" doublée ;
- l'intron du gène *hsp70* de maïs (stabilisant le niveau de transcription) ;
- la séquence *nptII* codant la néomycine phospho-transférase issue du transposon Tn5 isolé du colibacille ;
- la séquence suivant le gène *nptII* sur le transposon Tn5, composée d'une partie (153 pb sur 378) du gène *Ble* codant la bléomycine-phosphotransférase ;

¹ pb : paire de bases

- la séquence comportant les signaux de terminaison de transcription et de polyadénylation issue du gène de la nopaline-synthétase du T-DNA d'un pTi d'*A. tumefaciens*.

Le gène *nptII* de sélection présent dans le parent (1^{er} maïs) était encadré par deux sites *lox* et que lors du croisement avec la lignée de maïs portant le gène *cre* (2^{ème} maïs) codant la recombinase spécifique des sites *lox*, ce gène *nptII* a été éliminé. Le site *lox* (34 pb) reconnu par la seule recombinase CRE du bactériophage P1 est constitué d'une séquence de 8 pb flanquée de deux copies inversées d'une même séquence de 13 pb, sites d'accrochage de la recombinase CRE. L'excision, catalysée par la recombinase CRE, de l'ADN compris entre deux exemplaires de la séquence *lox* laisse sur l'ADN cible une copie recombinée de la séquence *lox*.

Lignée MON 810

La lignée parentale MON 810 a été obtenue par biolistique afin d'introduire le gène *cry1Ab* qui confère la résistance à certains insectes (lépidoptères), essentiellement pyrale et sésamie ;

- (3) Considérant que le maïs hybride LY038 x MON 810, résultat du croisement conventionnel des deux lignées parentales contient les deux transgènes suivants :

Cassette LY038

- le promoteur (1400 pb) de *Glb1* (codant une globuline spécifique de l'embryon dans le grain de maïs) ;
- le premier intron (500 pb) du gène *Act 1* (codant une actine de riz) connu pour stabiliser la transcription ;
- la séquence (200 pb) codant le peptide d'adressage au chloroplaste de la protéine mDHDPS de maïs ;
- la séquence codant une cDHDPS insensible à l'inhibition par la lysine (900 pb du gène *cordapA* de *Corynebacterium glutamicum*) ;
- la séquence de terminaison (1000 pb), transcrite mais non traduite, du même gène *Glb1* de maïs ;

Cassette MON 810

- le promoteur gouvernant la synthèse de l'ARN 35S chez le virus de la mosaïque du chou-fleur, avec deux copies de sa séquence "enhancer" (320 pb) ;
- l'intron *Zmhsp70* issu du maïs (800 pb) ;
- la séquence (3500 pb) optimisée dans le contexte végétal, codant la toxine Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* ;
- aucune séquence de terminaison particulière n'est décrite pour mettre fin à la transcription de ce transgène ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Les hybrides LY038 x MON 810 portent à l'état hémizygote et expriment les transgènes dominants conférant les caractères suivants :
- la biosynthèse accrue de lysine et de ses dérivés (acide α -aminoadipique et saccharopine) dans le grain par déblocage de l'étape limitante dû à l'expression d'une DiHydrate-DiPicolinate Synthétase (cDHDPS) insensible à la rétro-inhibition par la lysine ;
 - la résistance à certains insectes de la famille des lépidoptères (pyrale *Ostrinia nubilalis* et sésamie *Sesamia* spp) par production d'un variant de la protéine Cry1Ab issue de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* souche HD1 qui leur est toxique ;
- (2) Considérant que des hybridations de type Southern ont été réalisées et que l'analyse de ces hybridations permet de façon convaincante de montrer que les inserts présents chez LY038 x MON 810 correspondent bien aux inserts hérités de chacun des parents. La structure moléculaire des inserts de LY038 et MON 810 a été préservée chez l'hybride après le croisement conventionnel avec les lignées parentales homozygotes ;

Considérant que chaque événement LY038 et MON 810 contient une seule copie du fragment inséré, chacune sur un chromosome différent ;

Considérant que l'hybride ayant été obtenu de manière conventionnelle, il n'y a pas eu de modifications génétiques additionnelles réalisées et que l'hybride a conservé les caractéristiques moléculaires de chacune des lignées parentales (ADN introduit et régions bordures de chacune des insertions) ;

Considérant cependant que la localisation chromosomique exacte des transgènes sur la carte génétique du maïs n'est pas précisée dans le dossier ;

Considérant que, dans les lignées parentales, l'analyse des séquences à la jonction des inserts LY038 et MON 810 avec le génome du maïs n'a pas mis en évidence l'existence de protéines de fusion, ni de nouveaux peptides dont la séquence présenterait des motifs communs avec des peptides, répertoriés dans les banques de données, connus pour être toxiques ;

Considérant que les risques de recombinaison entre les deux événements de transformation reste hautement improbable, notamment du fait que ces événements sont localisés sur des chromosomes différents et qu'il n'existe pas à ce jour de mécanisme connu qui permette une telle recombinaison ;

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

Considérant que les quantités de protéines cDHDPS et Cry1Ab ont été analysées par la technique ELISA dans divers tissus, dont le fourrage et le grain, de maïs LY038 x MON 810 prélevés sur des plantes cultivées aux USA en 2002 lors d'essais multi-sites et comparées aux quantités exprimées dans les deux lignées parentales LY038 et MON 810 ;

Considérant que les résultats montrent que les quantités de protéines cDHDPS et Cry1Ab exprimées dans l'hybride LY038 x MON 810 et dans chacun des parents sont similaires (tableau 1) ;

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéines cDHDPS et Cry1Ab mesurées dans le fourrage et dans le grain prélevés aux USA, exprimées en µg/g de poids frais de tissu (écart-type)[gamme]

Tissu	cDHDPS		Cry1Ab	
	LY038 x MON 810	LY038	LY038 x MON 810	MON 810
Fourrage	0,23 (0,18) [0,019-0,64]	0,25 (0,021) [0,034-0,79]	3,6 (1,0) [1,4-5,1]	3,7 (0,70) [2,2-5,1]
Grain	24 (9) [11-38]	24 (9,1) [13-43]	0,39 (0,18) [0,13-0,68]	0,48 (0,14) [0,14-0,72]

Considérant que, comme attendu, l'expression de la protéine cDHDPS s'avère préférentielle dans le grain, compte tenu de la présence du promoteur *Glb1* spécifique de l'embryon (de l'ordre de 100 fois plus élevée dans le grain que dans le fourrage) et que la protéine Cry1Ab, dont le gène est sous le contrôle du promoteur dit constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur, s'exprime préférentiellement dans le fourrage ;

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

Considérant que la stabilité génétique des inserts a été vérifiée par hybridation moléculaire de type Southern sur plusieurs générations, que les deux événements sont hérités correctement chez l'hybride (hérédité mendélienne classique d'un gène dominant) ;

Considérant qu'une interaction entre les deux protéines chez l'hybride paraît invraisemblable, étant donné leurs fonctions totalement différentes : la protéine cDHDPS intervient dans l'anabolisme des acides aminés (début de la voie de biosynthèse de la lysine) et la protéine Cry1Ab induit une toxicité spécifique pour certains insectes en créant des pores dans leur paroi intestinale ;

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

(7.1-3) **Analyse comparative de la composition chimique**

Considérant que les données de composition du maïs parent LY038 ont permis de conclure que pour tous les paramètres analysés, hormis les teneurs en lysine et ses produits du catabolisme visés par la modification génétique, le maïs LY038 ne présente pas de différence de composition avec le maïs témoin ;

Considérant que le maïs parental MON 810 est autorisé à la consommation humaine depuis 1998 et qu'aucun effet délétère n'a été observé ;

Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir de plantes entières et de grains d'un maïs hybride portant les événements LY038 et MON 810 cultivé sur 5 sites aux Etats-Unis en 2002 (3 répétitions par site) et comparée à celle d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique que le maïs LY038 x MON 810 et d'échantillons provenant de 20 variétés commerciales ;

Considérant que l'analyse de composition des échantillons de plante entière a porté sur un ensemble de 10 paramètres (protéines brutes, matière grasse, cendres, humidité, ADF, NDF, lysine, Ca, P et hydrates de carbone) et pour les grains sur les mêmes paramètres ainsi que sur le taux de fibres totales, les acides aminés, la lysine libre, les acides gras (C8-C22), 9 minéraux (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn) ; 6 vitamines (B1 ; B2 ; B6 ; E ; Niacine, Acide folique), 2 facteurs antinutritionnels et 3 métabolites secondaires propres au maïs et 6 métabolites liés à la biosynthèse et au catabolisme de la lysine (l'homosérine, la cadavérine, l'acide 2,6-diaminopimélique, la saccharopine, l'acide α -aminoadipique et l'acide pipécolique) (75 paramètres au total) ;

Considérant que l'analyse statistique (analyse de variance) des différents paramètres montre que :

- sur 396 comparaisons, 92 des 114 différences statistiques relevées ($p < 0,05$) par rapport au témoin sont dans l'intervalle de confiance à 99 % des valeurs de référence des variétés commerciales. Sur les 22 valeurs qui sortent de cet intervalle de confiance, 15 valeurs diffèrent significativement en réponse à la modification génétique. Les 7 autres différences, notamment certains acides gras (tableau 2), concernent 1 ou 2 sites au maximum, et sont sans signification biologique ;

Tableau 2 : Différences significatives relevées sur la teneur en acides gras (% des acides gras totaux)

Evènement/ Acide gras	LY038 x MON 810	LY038	MON 810	Témoin
C16 :0	10,74 ^(b)	-	11,06 ^(a)	10,96 ^(a)
C18 :1	31,34 ^(a)	31,81 ^(a)	29,94 ^(b)	30,59 ^(b)
C18 :2	53,91 ^(b)	-	55,07 ^(a)	53,24 ^(c)
C18 :3	0,94 ^(a)	-	-	0,91 ^(b)

Les valeurs affectées d'une même lettre ne diffèrent pas significativement

- les teneurs en lysine et en saccharopine sont les seules modifications significatives (tableau 3) du compartiment des acides aminés, plus de 50 % des mesures de cadavérine et d'acide 2,6-diaminopimélique sont inférieures à la limite de détection (LOD) et la teneur en homosérine n'est pas modifiée ;

Tableau 3 : Taux comparé de lysine libre et de ses métabolites dans le maïs grain (exprimé en µg/g de matière sèche)

	LY038 x MON 810	LY038	MON 810	Témoin
Protéines (%MS)	13,06	12,90	12,27	12,12
Lysine libre	1507 ^(x)	1351 ^(ay)	26 ^(b)	26 ^(b)
Saccharopine	724 ^(x)	650 ^(ay)	6,6 ^(b)	5,9 ^(b)
Acide α-aminoadipique	64,7	56,6	<LOD	6,3 (1 site)
Acide L pipécolique	29,9 ^(x)	28,7 ^(x)	15,4 ^(by)	14,96 ^(by)

Les moyennes affectées d'une lettre différente diffèrent significativement (a différent de b et x différent de y).

- les teneurs des 10 acides aminés indispensables chez les animaux monogastriques, en dehors de la lysine, sont légèrement améliorées dans le maïs grain LY038 et LY038 x MON 810 en raison d'une augmentation du taux de protéines (tableau 4) ;
- la présence du gène *cry1Ab* n'affecte pas la teneur en lysine dans le maïs hybride LY038 x MON 810 ;

Tableau 4 : Comparaison des teneurs en acides aminés du grain de maïs LY038, LY038 x MON 810 et MON 810 (exprimées en % des acides aminés totaux)

Acides aminés indispensables ⁽¹⁾	LY038 x MON 810	LY038	MON 810	Témoin
Cystine	1,93 ^(b)	2,03 ^(a)	2,02 ^(a)	2,07 ^(a)
Histidine	2,74 ^(y)	2,73 ^(b)	2,88 ^(x)	2,88 ^(ax)
Isoleucine	3,38 ^(y)	3,41 ^(b)	3,47 ^(x)	3,52 ^(ax)
Lysine	3,80^(x)	3,81^(a)	2,63^(y)	2,70^(by)
Phénylalanine	5,14 ^(y)	5,14 ^(b)	5,22 ^(x)	5,22 ^(ax)
Σ acides aminés indispensables ⁽²⁾	40,54	40,70	40,01	40,21
Protéines brutes % de la matière sèche	13,06	12,90	12,27	12,12

(1) Acides aminés présentant une différence statistique.

Les moyennes affectées d'une lettre différente diffèrent significativement

(2) Σ= Somme des 10 acides aminés indispensables pour les animaux monogastriques

Considérant que l'ensemble des données analytiques présentées permet de conclure que le maïs LY038 x MON 810 n'est pas équivalent en substance à son témoin ayant le même fonds génétique en raison de sa modification génétique qui vise à un enrichissement spécifique en lysine (+ 46 %), constituant un avantage nutritionnel substantiel pour l'alimentation animale, prévenant les carences (en lysine) et évitant au moins partiellement une supplémentation excessive (en lysine de synthèse) des aliments composés pour animaux ;

Considérant que pour tous les autres paramètres analysés, le maïs LY038 x MON 810 ne présente pas de différence de composition avec le maïs témoin ;

(7.4) **Analyse comparative des caractères agronomiques**

Considérant que le taux de germination est similaire pour les maïs portant l'événement LY038 x MON 810 et pour le témoin et que la présence de lysine libre et de ses métabolites ne perturbent pas la viabilité de l'embryon ;

(7.8) **Toxicologie****Exposition potentielle de l'homme à des maïs enrichis en lysine**

Considérant que :

- selon diverses estimations, les besoins en lysine seraient de :
 - 12 mg/kg p.c./j (soit 840 mg/j pour un adulte de 70 kg) (FAO, 1985)² ;
 - 30 mg/kg p.c./j (soit 2100 mg/j pour un adulte de 70 kg) (ANC, 2001)³ ;
 - 31 mg/j (soit 2170 mg/j pour un adulte de 70 kg) ("Dietary Reference intakes" FNB/IOM, 2002)⁴ ;
- la consommation de lysine est de 5,3 g /j pour un adulte (incluant les compléments alimentaires) en Amérique du Nord (FNB/IOM, 2005)⁵ et de 6,1 g/j en France de (Martin *et al*, 2004)⁶ et qu'aucune limite de sécurité n'a été fixée pour la lysine, l'apport supplémentaire éventuel en lysine par le maïs LY038⁷ qui représenterait 1,1 mg/j pour un adulte de 70 kg, soit 700 à 1900 fois moins que l'apport nutritionnel recommandé selon les estimations, ne présenterait pas un risque pour le consommateur⁸ ;

Toxicité liée à la présence des protéines cDHDPS et Cry1Ab

Considérant que plusieurs éléments permettent de considérer que les protéines cDHDPS et Cry1Ab n'auront pas d'effet toxique ou délétère :

- l'organisme donneur *C. glutamicum* est une bactérie commune de l'environnement qui n'est pas connue pour être pathogène chez l'homme ou l'animal ;
- l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine cDHDPS synthétisée par *E. coli* ou extraite de LY038 et celle de la protéine Cry1Ab synthétisée par *E. coli* ou extraite de MON 810 ont été démontrées ;
- la comparaison des séquences de la protéine issue de *C. glutamicum* avec celle d'*E.coli*, du maïs, du riz, du blé et du soja montre une identité comprise entre 27 et 37 % et une similarité comprise entre 36 et 47 % ;
- la dose sans effet observé de la protéine cDHDPS chez la souris après une administration unique par voie orale est supérieure à 800 mg/kg p.c.⁹ et celle de la protéine Cry1Ab est de 4000 mg/kg p.c.;
- la comparaison des séquences de la protéine cDHDPS exprimée dans le maïs LY038 et celle des séquences de la protéine Cry1Ab exprimée dans le maïs MON 810 avec les séquences de peptides répertoriés dans des bases de données et connus pour présenter des propriétés toxiques, ne montre aucune homologie de séquence avec ces peptides ;
- les protéines cDHDPS et Cry1Ab ont des modes d'actions différents et s'accumulent dans des compartiments cellulaires différents, respectivement les chloroplastes et le cytoplasme ;
- deux métabolites majeurs de la lysine, l'acide α -aminoadipique et la saccharopine, sont présents dans des végétaux consommés par l'homme à des teneurs voisines de

² FAO/OMS (1985). Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU expert consultation, Technical report series 724.

³ Martin A., Azais-Braesco V., Bresson J.-L., Couet C., *et al*. Eds. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris, Tec&Doc.

⁴ FNB/IOM (2002). Protein and amino acids. In: FNB/IOM Eds. Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (macronutrients). Washington D.C., The National Academies Press, pp. 1-143.

⁵ FNB/IOM (2005). Protein and Amino acids. In: Eds. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington, D.C., The National Academies Press, pp. 589-768.

⁶ Martin A., Touvier M. and Volatier J. L. (2004). The basis for setting the upper range of adequate intake for regulation of macronutrient intakes, especially amino acids. *J Nutr*, 134, pp. 1625S-1629S; discussion 1630S-1632S, 1667S-1672S.

⁷ Compte tenu des quantités de maïs importées dans l'UE, de la part que représenterait le maïs LY038 dans ces importations, 0,2 % de maïs LY038, correspondant à une consommation de 3 mg/j (fort consommateur au 97,5^{ème} percentile), contenant au maximum 5300 μ g/g de lysine pourrait être consommé par l'homme.

⁸ Des déficits enzymatiques rares peuvent entraîner une intolérance à la lysine (déficits en lysine-cétoglutarate réductase, en transporteur des acides aminés basiques ou en aminoadipique-semialdéhyde glutamate réductase (avis de l'Afssa du 18 décembre 2006)

⁹ p.c. : poids corporel

celles mesurées dans le grain des maïs LY038 et la marge de sécurité est de 6.10^4 pour un adulte et de 3.10^6 pour un enfant¹⁰ ;

Toxicité subchronique

LY038

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique 90 jours a été réalisée, selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales, avec des rats des deux sexes (3 groupes de rats, 20 animaux de chaque sexe par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation de maïs grain LY038 incorporé à hauteur de 11% (supplémenté avec 22 % de maïs témoin) ou 33% dans la ration alimentaire en comparaison avec un maïs témoin ayant le même fonds génétique (incorporé à hauteur de 33 % dans la ration) ;

Considérant que dans son avis du 5 juin 2007, l'Afssa estime que *les faibles amplitudes des variations observées chez un seul sexe pour chaque paramètre concerné, lesquelles demeurent dans les la fourchette des valeurs historiques de la souche de rat pour le centre investigateur, permettent de conclure à une absence d'effets toxiques particuliers liés à l'ingestion répétée de maïs grain LY038 aux deux doses étudiées correspondant à l'ingestion maximale de 0,4 mg de protéine cDHDPS par kg de poids corporel* ;

MON 810

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique (90 jours) a également été réalisée en 2003, selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales et que, dans son avis du 18 juillet 2003, l'Afssa a conclu *qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique* ;

LY038 x MON 810

Considérant que l'absence d'une étude de toxicité subchronique (90 jours) par administration orale est acceptable dans la mesure où :

- aucun événement significatif ayant un sens toxicologique n'a été rapporté lors des études précédentes sur les lignées parentales à l'origine de l'hybride ;
- les mécanismes d'action des protéines d'intérêt empruntent des voies métaboliques différentes, laissant supposer un faible risque d'interaction pouvant conduire à une potentialisation d'effet toxique (EFSA 2005a¹¹) ;
- les résultats de l'étude d'alimentarité chez le poulet (cf paragraphe 7.10) ne mettent pas en évidence d'effet délétère chez ces animaux ;

et en prenant en compte la notion de l'accumulation d'évidences (weight of evidence), maintenant intégrée dans différentes lignes directrices, visant à pondérer les résultats "isolés" à la lumière d'un faisceau convergent d'arguments ;

(7.9) Allergénicité

Considérant qu'au regard des éléments suivants, l'existence d'un potentiel allergénique de ces protéines ne peut pas être suspectée :

- la comparaison de la structure de la protéine cDHDPS exprimée dans le maïs LY038 x MON 810 et celle de la protéine Cry1Ab avec les protéines répertoriées dans les bases de données d'allergènes connus ne met pas en évidence de structure commune avec des peptides pouvant présenter un potentiel allergénique ;
- la protéine cDHDPS produite par *E. coli* est dégradée *in vitro* en milieu gastrique simulé à 96 % en 30 secondes ;

¹⁰ Considérant que selon le régime anglais, la consommation moyenne de maïs pour adulte (70 kg) est de 15,5 g/j et pour un enfant (14,5 kg) de 6,2 g/j, dans le pire des cas, 0,2 % de maïs LY038 contenant 26 µg/g de protéine cDHDPS entrerait dans la consommation et la dose sans effet observé est de 800 mg/kg p.c. chez la souris, la marge de sécurité serait de 7.10^7 pour un adulte et de 7.10^6 pour un enfant. Si l'on considère la dose sans effet observé déduite de l'étude 90 jours chez le rat de 25000 mg/kg p.c./j cette marge de sécurité est de 6.10^4 pour un adulte et de 3.10^4 pour un enfant.

¹¹ EFSA. (2005a) Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on an application (reference EFSA-GMO-BE-2004-07) for the placing on the market of insect-protected glyphosate-tolerant genetically modified maize MON 863 x MON 810 x NK603, for food and feed uses, and import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. The EFSA Journal, Question No EFSA-Q-2004-159, 1-25.

- la protéine Cry1Ab produite par *E. coli* est dégradée *in vitro* en milieu gastrique simulé en deux minutes (ce test de dégradation a déjà été validée dans le cas de l'autorisation de l'événement MON 810) ;
- les protéines cDHDPS et Cry1Ab ne sont pas glycosylées dans le maïs LY038 x MON 810 ;
- la protéine cDHDPS présente une grande similitude avec la protéine produite par fermentation du *C. glutamicum* ;

Considérant qu'il convient cependant de noter que ces données, notamment les résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et la 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 (1300 poussins) nourri pendant 42 jours avec deux régimes [correspondant aux périodes de démarrage (0-21 jours), de croissance et de finition 21-42 jours)] à base de maïs grain LY038 x MON 810 (> 60 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique supplémenté¹² ou non en lysine et avec 5 variétés commerciales supplémentées ou non en lysine ;

Considérant que les observations ont porté sur des paramètres zootechniques et de rendement sur carcasse et que le taux de mortalité enregistré (1,2 %) au cours de l'expérimentation est non lié au traitement ;

Considérant que les performances de croissance et de consommation, l'indice de consommation et les critères de carcasse et de découpe répondent remarquablement au taux de lysine des rations (P<0,001) (tableau 5) et que les résultats présentés permettent également d'exclure tout effet néfaste non intentionnel lié à la modification génétique ainsi que tout effet autre (mycotoxines, pesticides...) ;

Tableau 5 : Protocole expérimental et résultats
(poids des animaux, efficacité, poids du muscle pectoral frais)

Régime N°	6	10	13	11	5	8
Maïs	LY038	LY038 x MON 810	Témoin	Témoin	Variété commerciale	Variété commerciale
Supplémentation en lysine (%) ⁽¹⁾ .	0	0	0	+	0	+
Lysine (%) ⁽²⁾	1,05 0,90	1,05 0,90	0,97 0,82	1,05 0,90	0,97 0,82	1,05 0,90
Poids des animaux à 42j (kg)	2,29	2,24	1,72	2,30	1,67	2,18
Efficacité alimentaire (gain de poids en kg/kg d'aliment consommé)	0,56	0,56	0,50	0,56	0,47	0,55
Poids du muscle pectoral (g)	350	330	220	350	210	320

(1) Rééquilibrage du taux par rapport à LY038 ; (2) Rations démarrage et finition respectivement ;

¹² L'étude a été effectuée en substituant au maïs expérimental LY038 dans la ration formulée avec un taux de lysine suboptimum (en dessous) du besoin pour les performances maximum. Toutes les rations ont été équilibrées à 105 % des besoins pour Met, Cyst, Arg, Thr et Try de façon à ce que seule la lysine soit le facteur limitant primaire, en évacuant l'hypothèse d'un facteur limitant secondaire. Les rations avaient une teneur maximum en maïs (> 60%), à base de maïs témoin à 0,26% de lysine par rapport au poids frais et /ou à base de LY038 à 0,37% de lysine.

Considérant l'ensemble des résultats présentés, il est possible de conclure que le maïs LY038 x MON 810 qui contient plus de lysine (libre) par rapport à son poids frais, a une valeur alimentaire augmentée par rapport à son témoin et aux cinq variétés commerciales testées et que la lysine supplémentaire générée par la modification génétique est aussi biodisponible que la lysine de synthèse (issue de la fermentation microbienne) ;

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime qu'en se fondant sur les résultats présentés dans ce dossier, notamment la construction génétique, le métabolisme de la lysine dans le maïs grain LY038 x MON 810 et l'étude d'alimentarité (poulets nourris avec du maïs grain), la consommation de maïs LY038 x MON 810 portant les deux événements de transformation LY038 et MON 810 par les animaux présente le même niveau de sécurité sanitaire que la consommation de maïs non génétiquement modifié.

Bien qu'il soit précisé que le maïs LY038 x MON 810 sera destiné à l'alimentation animale, il n'est pas exclu que ce maïs puisse se retrouver dans l'alimentation humaine. Compte tenu des données fournies et des besoins en lysine chez l'homme comparés au niveau d'expression dans le maïs LY038 x MON 810, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que la consommation de maïs LY038 x MON 810 par l'homme présente le même niveau de sécurité sanitaire que la consommation de maïs non génétiquement modifié.

Pascale BRIAND

Annexe

Mode d'obtention du maïs hybride LY038 x MON 810

Ces deux lignées homozygotes résultent d'introgession des transgènes chimériques *cordapA* (biosynthèse accrue de lysine) et *Cry1Ab* (résistance à la pyrale et la sésamie) respectivement dans des lignées élités de fonds génétiques souhaités (aptés par interfécondation à donner des semences portant des embryons hybrides, donc de futures plantes manifestant l'hétérosis ou vigueur hybride).

L'introgession consiste tout d'abord en la stabilisation des transgènes par des autofécondations de sorte à obtenir des homozygotes capables de transmettre ces nouveaux caractères dominants à tous leurs descendants.

L'introduction du transgène dans le fonds génétique souhaité (lignée élite utilisée pour obtenir des semences hybrides) est réalisée par un premier croisement suivi d'une série de rétro-croisements utilisant le pollen de la lignée élite souhaitée pour féconder un individu portant le transgène. La présence du transgène est le critère pour choisir les plantes receveuses à chaque génération. En une génération, on a 50 % du génome de chaque parent. Puis, au fur et à mesure des rétro-croisements avec la même lignée élite, le génome souhaité représente 75 %, 87,5 %, 93,75 %, 96,875 %, 98,4375 % tandis que le transgène (toujours présent dans la plante choisie pour être fécondée par le pollen de la lignée élite) est inclus dans les 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,5625 % de ce qui demeure de la plante génétiquement modifiée d'origine. Cinq rétro-croisements permettent donc d'obtenir à presque 99 % une plante isogénique avec la lignée élite choisie comme pollinisatrice au cours du croisement initial et des rétro-croisements successifs. (Si la sélection des individus peut être assistée par des marqueurs moléculaires, le processus d'introgession est plus rapide.) Les générations successives fruits de rétro-croisements sont évidemment à l'état hémizygote pour le transgène.

Il ne reste plus qu'à réaliser plusieurs générations d'autofécondation pour d'obtenir quasiment la même lignée élite que celle de fonds génétique souhaité, à l'exception du transgène à l'état homozygote cette fois. La première autofécondation conduit à 25 % de plantes non génétiquement modifiées, 50 % de plantes hémizygotés pour le transgène et 25 % de plantes homozygotes pour le transgène, ces dernières le seront donc au cours des générations d'autofécondation.

Chaque transgène (LY038 d'une part, MON 810 d'autre part) est donc ainsi introgressé à l'état homozygote dans une lignée adaptée pour donner des hybrides. La lignée bonne receveuse possédant un transgène une fois fécondée par la lignée bonne pollinisatrice correspondante portant l'autre transgène fournira les grains qui, une fois semés, donneront lieu à une culture homogène de plantes hybrides LY038 x MON810 portant chaque transgène à l'état hémizygote et donc vigoureuse, résistante à la pyrale et la sésamie et aux grains riches en lysine. Ce sont ces grains et dérivés de ces plantes hybrides qui font l'objet du présent dossier.