

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 MIR 604 résistant à des insectes, 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 MIR 604 résistant à des insectes, 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-2005-11).

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 17 novembre 2005, l'Agence française de sécurité des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

Cette demande de mise sur le marché porte sur un maïs MIR 604 génétiquement modifié par l'introduction d'un gène codant une protéine Cry3A, toxique pour les coléoptères comme *Diabrotica* et d'un gène marqueur codant une phosphomannose-isomérase conférant aux cellules de la plante génétiquement modifiée l'aptitude à transformer le mannose-6-phosphate, normalement non catabolisé, en fructose-6-phosphate entrant dans le métabolisme normal des végétaux.

(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).

Le matériel génétiquement transformé est sélectionné *in vitro* sur milieu nutritif contenant du mannose-6-phosphate comme seule source de carbone ; les cellules végétales sauvages étant incapables de cataboliser ce sucre, donc de se développer sur ce substrat, mais par contre pouvant utiliser le produit de son isomérisation (fructose-6-phosphate), seules les cellules ayant reçu le transgène peuvent s'y multiplier.

- (2) Considérant que le vecteur de transformation pZM26 est un plasmide de 13811 pb comportant, outre l'ADN-T décrit plus bas :
- un gène bactérien de 789 pb originaire du transposon Tn7 codant une aminoglycoside 3'adenyltransferase qui détermine la résistance à la spectino-, l'érythro- et la

streptomycine, permettant donc la sélection des bactéries sur les milieux contenant un de ces antibiotiques ;

- 405 pb comportant l'origine végétative de réplication à large spectre d'hôte chez les bactéries Gram négatives (*oriVS1*), originaire d'un plasmide découvert chez *Pseudomonas*, et formant avec le gène *repA* un réplicon fonctionnel chez *Agrobacterium* ;
- 807 pb issues du plasmide colicinogène E1, comportant son origine de réplication restreinte à *E. coli* ;
- les 2 frontières de 25 pb issues de l'ADN-T d'un pTi à nopaline, et entre lesquelles sont introduits les gènes chimériques destinés à être transférés au génome nucléaire des cellules végétales ;
- 726 pb correspondant à un allèle de *virG* (*virGN54D*) portant une substitution rendant son activité constitutive ;
- 1074 pb comportant le gène *repA* originaire du plasmide VS1 isolé chez *Pseudomonas* dont le produit reconnaît spécifiquement l'origine VS1 et permet l'initiation de sa réplication ;

(3) Considérant que L'ADN-T porté par le vecteur de transformation pZM26 est constitué de deux cassettes qui sont, de la frontière gauche à la frontière droite :

- la cassette *mCry3A* :
 - 2556 pb originaires du maïs correspondant au promoteur à expression (en principe) préférentielle dans les racines d'un gène codant une protéine proche des métallothionéines ;
 - 1797 pb comportant une séquence synthétique codant une version modifiée¹ du gène *cry3A* de *Bacillus thuringiensis* ;
 - 253 pb issues du signal de terminaison de transcription du gène de l'ADN-T codant la nopaline synthase ;
- la cassette *pmi* :
 - 1993 pb originaires du maïs correspondant au promoteur à expression constitutive et les 1010 pb du premier intron du gène de maïs codant l'ubiquitine ;
 - 1176 pb du gène du colibacille *pmi* codant la phospho-mannose isomérase, enzyme catalysant l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate ;
 - 253 pb issues du signal de terminaison de transcription du gène de l'ADN-T codant la nopaline synthase ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(2) Considérant que les analyses de type Southern montrent qu'il y a une insertion unique sans présence d'ADN du vecteur et que les séquences introduites ne sont présentes qu'à un seul exemplaire par génome haploïde ;

Considérant que le séquençage de l'insertion et de ses régions bordures a été réalisé et que l'analyse des séquences montre que :

- concernant l'ADN-T, en comparaison de la construction portée par le plasmide vecteur, l'absence de 43 pb du côté de la bordure droite et 44 pb du côté de la bordure gauche, ainsi que 3 changements de bases ; l'un sans effet se situe dans le promoteur métallothionéine-like, les 2 autres conduisent à des substitutions d'acides aminés dans la protéine PMI sans en altérer la fonction : une valine en position 61 remplacée par une alanine (également aliphatique) et une glutamine (acide) en position 210 remplacée par une histidine (basique) ;
- concernant la région du génome de maïs hébergeant les transgènes, elle n'est pas encore bien annotée ce qui signifie qu'aucun gène majeur n'y a encore été décrit. En

¹ Parmi ces modifications, dont l'objectif est de permettre une meilleure expression dans la plante et une toxicité supérieure pour les insectes cibles, celles ayant un impact sur la séquence protéique sont l'élimination des 16 premiers acides aminés et l'insertion d'un site de reconnaissance pour la cathepsine-G (alanine-alanine-proline-phenylalanine) à la place des acides aminés valine-155, sérine-156 et sérine-157 de la protéine native, ce qui a pour effet d'accroître la toxicité vis à vis de *Diabrotica virgifera virgifera* et *Diabrotica longicornis barberi*, responsables majeurs des dégâts dans les cultures de maïs.

outre, les 6 phases potentielles de lecture dans les zones de jonction en 5' comme en 3' entre ADN-T et ADN de la plante ne comportent pas de nouveau cadre de lecture ouverte, ce qui indique que l'insertion n'a pas conduit à l'apparition d'un nouveau peptide dans la plante ;

Considérant que l'insertion de ce transgène est nette et que l'ensemble des données fournies sur l'analyse génétique de ce transgène ne suggère pas que des effets inattendus puissent être liés à cette insertion ;

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

Considérant que la teneur en protéines mCry3A et PMI a été évaluée dans différents organes des plantes prélevés à différents stades de maturité par la méthode ELISA à la fois dans une lignée pure (autopollinisation) et dans deux hybrides différents porteurs de l'événement de transformation ;

Considérant que la teneur moyenne en protéine mCry3A est comprise entre :

- 3 et 23 µg/g de poids frais dans les feuilles (4-94 µg/g de poids sec),
 - 2 et 14 µg/g de poids frais dans les racines (7-62 µg/g de poids sec),
 - 0,9 et 11 µg/g de poids frais dans la plante entière (3-28 µg/g de poids sec),
 - 0,6 et 1,4 µg/g de poids frais dans le grain (0,8-20 µg/g de poids sec),
- et qu'elle est indétectable dans le pollen ;

Considérant que la teneur en protéine PMI est comprise entre :

- non détectable et 0,4 µg/g de poids frais dans les feuilles,
- <0,03 et 0,2 µg/g de poids frais des racines,
- <0,02 et 0,3 µg/g de poids frais dans la plante entière,
- <0,06 et 0,4 µg/g de poids frais dans les grains,
- 1,9 et 2,6 µg/g de poids frais dans le pollen ;

Considérant que les teneurs en protéines mCry3A et PMI selon les stades végétatifs et les parties de la plante sont les suivantes (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneur en protéines recombinées, exprimée en µg/g de poids frais dans différents tissus de maïs MIR 604

Paramètre	Feuille	Racine	GRAIN	Plante entière	Ensilage 75 j
CRY3A (1)					
Maturité	6,2-19	2-14	0,8-1,4	6,8-11,1	2,3
Sénescence	3,3-4,5	2-3,9	0,6-1,3	2,3-5,9	2,5
PMI (2)					
Maturité	0-<0,10	<0,05	0,14-0,35	0,05-0,06	0
Sénescence	0-<0,06	<0,03-0,06	0,06-0,21	0,02-0,11	0

(1) Quantité maximum produite 600 g/hectare/an

(2) Les teneurs en PMI sont très faibles, voire inférieures à la limite de détection

Considérant que l'expression de la protéine mCry3A est la plus élevée dans la partie aérienne, que le grain à maturité en contient beaucoup moins et que la teneur baisse lors de la sénescence de la plante ou lors de l'ensilage ;

(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 5^{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 6^{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 de variétés portant l'événement MIR 604 cultivées aux Etats-Unis en 2002 et 2003 sur 12

sites (avec 3 répétitions par site) et d'échantillons de deux variétés de maïs témoin cultivées conjointement avec les variétés MIR 604, et qu'elle porte :

- sur le grain pour un ensemble de paramètres dont notamment : 10 minéraux, 13 vitamines dont tous les tocophérols connus, 18 acides aminés, 5 acides gras, 7 métabolites secondaires dont certains facteurs antinutritionnels potentiels (acide phénolique, furfural, acide phytique, inositol, raffinose, acide férulique, acide paracoumarique, inhibiteur de trypsine), le cholestérol et des phytostérols : campestérol, β sitostérol et stigmastérol ;
- sur la plante entière, notamment les teneurs en constituants fibreux (ADF ; NDF) ;

Considérant que les résultats montrent que, sur 11000 données analysées, on n'observe pas de différence significative entre les variétés portant l'évènement MIR 604 et ses témoins ; il convient de noter cependant que la teneur en protéines et en potassium du grain MIR 604 est supérieure en 2003 à celle du grain témoin, alors que la différence n'est pas significative en 2002 ; de même, la teneur en α tocophérol est plus faible dans le grain MIR 604 que dans le grain témoin en 2003 ; la teneur en zinc est plus faible dans le grain MIR 604 que dans le témoin en 2002 ; la teneur en phytostérols est supérieure dans le grain MIR 604 que dans le témoin en 2003 ;

Considérant que, bien que l'analyse de variance n'ait pas inclus ou pas pu inclure (en raison de la non orthogonalité des mesures entre années successives) l'effet "année" de culture qui aurait permis d'annuler ces effets sporadiques statistiquement significatifs mais sans fondement biologique, sur la base de la qualité des données disponibles, on peut conclure à une équivalence en substance du grain porteur de l'évènement MIR 604 avec le grain de maïs témoin ;

(7.4) **Caractéristiques agronomiques**

Considérant que les données issues de 22 localités situées dans 8 Etats des Etats-Unis (y compris Hawaï et Porto Rico) en 2002 et 2003 ne font pas apparaître de différences majeures entre hybrides porteurs de la modification MIR 604 pour ce qui concerne la sensibilité aux champignons parasites, *Helminthosporium* et *Cercospora* ; par contre, suivant le degré d'infestation des sites par le ver de la racine, le rendement peut être augmenté (x 2 à Bloomington, Illinois), avec une sévérité des attaques de la plante par la larve divisée par 3, répondant aux objectifs de l'introduction du gène de résistance ;

(7.5) **Spécificité**

Considérant que les caractéristiques physico-chimiques des protéines extraites du maïs MIR 604 et les protéines d'origine microbienne ont été comparées et montrent que ces données ne mettent pas en évidence de différences qui suggèreraient un effet potentiel de ces protéines (tableau 2) :

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques comparées des protéines extraites du maïs portant l'événement MIR 604 et les protéines d'origine microbienne

Paramètre	CRY 3A		PMI (1)
	Microbienne	Plante (MIR 604)	Microbienne
Origine	Microbienne	Plante (MIR 604)	Microbienne
Poids moléculaire	67 700	67 700 55 000 dégradée (4)	45 000
Inactivation (5) (Pepsine)	95°C, 30 minutes 37°C en 2'	- 37 °C en 2'	65°C en 30' 37°C en 2' (10')
Toxicité CL 50 (2)	0,43 (0,14-0,94)	0,20 (0,09-0,41)	-
Séquence acides aminés	Deux protéines (3) 598 aa 598 aa + 16 aa CL 50 idem= 1,4 µg/ml		Séquence de 8 acides aminés idem à a-paralbumine de Rana sp CH 2001, Indonésienne

- (1) Activité enzymatique spécifique identique de la protéine microbienne et de la protéine issue de la plante ;
(2) Concentration létale pour 50 % des larves, en µg/ml de solution en 144 heures.
(3) PM= 67700 par SDS PAGE ; 67519 par HPLC-SM et PM = 69500 par SDS PAGE ; 69138 par HPLC-SM. Deux protéines dans les proportions de 2:3, homologues à 97,4%, stables dans le temps.
(4) Deux bandes de migration en SDS PAGE.
(5) Disparition de la forme active initiale.

(7.6) Effets des traitements technologiques

Considérant que l'effet du traitement par voie humide et par voie sèche des grains sur la teneur en protéine mCry3A, a été testé et montre que la voie humide réduit la teneur en protéine exprimée mCry3A, que cette protéine est absente de l'amidon, du germe donc de l'huile et des flocons de maïs (trempage à 80 °C et floconnage à 197 °C), qu'elle est plus spécialement présente dans la semoule qui est toujours consommée après cuisson et qu'elle est considérablement réduite dans le gluten meal par rapport au grain cru (tableau 3) :

Tableau 3 : Teneur résiduelle en protéine CRY3A suivant le traitement technologique du grain (µg/g de poids frais, récolte 2002)

Voie humide		Voie sèche	
Grain	1,06	Mouture	0,69-0,92
Fibres	0,26-0,46	Fibres	1,42
Amidon, germes	<0,06	Farine	0,40
Gluten (meal)	0,24	Semoule	2,12
Eau de trempage	<LD	Huile, flocons	<LD

(7.8) Toxicologie

- (7.8.1) Considérant que la toxicité aiguë des protéines mCry3A et PMI a été évaluée chez la souris par administration orale et qu'à la dose de 2377 mg/kg p.c. pour la protéine mCry3A et de 3080 mg/kg p.c. pour la protéine PMI, on n'observe aucun effet néfaste chez l'animal ;

Considérant que ces protéines sont rapidement dégradées *in vitro* en milieu gastrique simulé et qu'elles ne présentent pas d'homologie de structure avec des protéines répertoriées dans les banques de données, connues pour être toxiques, immunotoxiques ou avoir une activité pharmacologique ;

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours avec des rats des deux sexes (51 rats de chaque sexe) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (10 et 41,5%) du maïs grain MIR 604 en comparaison avec un maïs témoin "isogénique" ;

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres urinaires et sanguins 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 n'observe aucun effet sur l'activité motrice, sur les données ophtalmologiques ou histologiques ou sur le poids des organes, associé à la consommation de maïs MIR 604 ; il convient cependant de noter, chez des rats mâles, une réduction significative du poids moyen seulement chez ceux qui consomment le régime contenant 10 % de maïs MIR 604, dès la deuxième semaine d'expérience et qui se poursuit jusqu'à la 14^{ème} semaine, en association avec une réduction de la quantité d'aliment consommé et une diminution du nombre de globules blancs (neutrophiles) mais les femelles consommant le même régime présentent de meilleures performances pondérales ; le contrôle rigoureux analytique des aliments n'a pas permis de mettre en évidence une origine nutritionnelle liée aux constituants majeurs, aux toxiques (Fluor, Pb, Cd...) ou à la présence éventuelle d'aflatoxine, de germes microbiens ou de champignons ;

Considérant que ces quelques différences ne peuvent pas être considérées comme étant en relation avec la consommation de maïs MIR 604 dans la mesure où ces différences ne s'observent que chez un seul sexe et que pour la dose la plus faible ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que l'absence de glycosylation des protéines Cry3A et PMI 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 la protéine mCry3A et PMI avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ; il convient de noter qu'une seule séquence homologue de 8 acides aminés entre la protéine PMI et la protéine α -paralbumine de *Rana sp* d'Indonésie a été trouvée mais qu'aucune réaction croisée entre la protéine PMI et les IGE du sérum du seul patient connu allergique à la protéine de la grenouille (Serum screening methodology) n'a été observée ;

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 57,5 %, 63 % et 67,5 % (correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition) de maïs MIR 604, en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin et un régime type de référence ;

Considérant que l'analyse de la protéine mCry3A montre qu'elle est présente aux taux de 0,04 ; 0,06 et 0,08 $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de la ration et que l'analyse de composition du grain de maïs MIR 604 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 ;

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 (7 paramètres disponibles) ; il convient de noter que les seules différences observées concernent un effet significatif du sexe des animaux sur les performances, ce qui traduit la qualité du dispositif

expérimental et des mesures, ainsi que des performances meilleures avec le régime à base de MIR 604 et de son témoin par rapport au régime de référence type de référence ;

Considérant que sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à la fois à une équivalence nutritionnelle du maïs grain cru MIR 604 porteur des deux 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 MIR 604 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que le maïs conventionnel et ses produits dérivés.

Pascale BRIAND