

Maisons-Alfort, le 17 septembre 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 3272 développé pour exprimer une alpha-amylase
thermostable afin d'optimiser la production d'éthanol,
au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 juillet 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 développé pour exprimer une alpha-amylase thermostable afin d'optimiser la production d'éthanol. La finalité première de cet OGM n'est pas une utilisation en alimentation. Néanmoins, d'une part, les co-produits de la production d'éthanol pouvant être utilisés en alimentation animale et, d'autre part, la présence de faibles traces de maïs portant l'événement 3272 dans les maïs destinés à l'alimentation humaine et animale ne pouvant être exclue, la demande d'autorisation porte sur 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-2006-34).

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'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 14 septembre 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

La présente demande porte sur la mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié développé pour exprimer une alpha-amylase thermostable afin d'optimiser la production d'éthanol.

Le maïs 3272 est porteur d'un double événement qui lui confère, l'expression de deux enzymes, l'alpha-amylase thermostable (AMY797E) et une phosphomannose isomérase (PMI) codée par le gène *pmi* (*man4*).

Le gène synthétique *amy797E* codant pour une alpha-amylase thermostable AMY797E a été introduit dans le génome du maïs 3272 afin d'être utilisé dans la production éthanol fuel broyé à sec (dry-grind). Les alpha-amylases produites microbiologiquement sont communément utilisées commercialement dans l'étape de transformation de l'amidon pendant les processus de broyage à sec et de mouture humide du maïs. Le but de la lignée transgénique du maïs 3272 est d'utiliser le grain de maïs comme source de l'enzyme alpha-amylase dans la production d'éthanol broyé à sec, afin de remplacer l'ajout d'enzyme produite microbiologiquement.

Le maïs 3272 sera utilisé en mélange avec du maïs conventionnel.

La PMI catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Cette enzyme est utilisée comme marqueur de sélection des cellules de maïs transformées. Cette enzyme permet la survie des cellules de maïs dans un milieu qui contient uniquement du mannose comme seule source de carbone. Cette enzyme perd son activité pendant le processus de production d'éthanol broyé à sec.

(C) Informations relatives à la modification génétique

Considérant que l'événement 3272 a été introduit par transformation d'embryons immatures de maïs avec une souche désarmée d'*Agrobacterium* portant le vecteur de transformation pNOV7013 et que l'ADN-T comporte les éléments suivants :

Composant	Taille	Fonction et origine de la séquence
Promoteur de la Gzéine	677 paires de base (pb)	Promoteur d'une zéine de 27kDa qui conduit à l'expression spécifique dans l'albumen
<i>amy797E</i>	1383 pb	Gène chimérique de l'alpha-amylase 797GL3 thermostable obtenu à partir des séquences de trois alpha-amylases de souches de Thermococcales (hyperthermophiles). De plus, la séquence comprend une séquence codant pour un peptide signal de 19 acides aminés de la gamma-zéine et une séquence codant pour un peptide C-terminal SEKDEL (signal de rétention dans le réticulum endoplasmique). Le gène a été modelé en tenant compte de l'usage préférentiel des codons chez le maïs.
PEPC9	108 pb	Intron n°9 de la PEPC de <i>Zea mays</i>
35S terminateur	70 pb	Séquence de terminaison du RNA 35S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur. Sa fonction est de fournir une séquence de polyadénylation.
Promoteur de ZmUbilntron	1993 pb	Région promotrice de <i>Zea mays</i> du gène de polyubiquitine qui contient le premier intron et confère une expression constitutive chez les monocotylédones.
<i>pmi</i>	1176 pb	Gène <i>manA</i> codant la phosphomannose isomérase (PMI). L'enzyme catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate et est utilisée comme marqueur de sélection.
NOS	253 pb	Séquence de terminaison du gène <i>nos</i> d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

Considérant que la construction comprend donc deux gènes, l'un codant l'alpha-amylase (AMY797E) et l'autre codant la phosphomannose isomérase (PMI) et servant de marqueur de sélection et qu'en raison du promoteur utilisé et des peptides signaux de l'enzyme, l'expression de l'alpha-amylase est ciblée dans l'albumen et l'enzyme reste dans le réticulum endoplasmique ;

Considérant que, pour la production d'éthanol à partir de maïs, des amylases thermostables d'origine bactérienne et ne demandant que peu de chlorure de calcium pour fonctionner sont couramment utilisées. Le maïs GM portant l'événement 3272 satisfait ces deux critères (amylase thermostable et demande faible en calcium) ;

Considérant que la modification génétique réalisée n'a pas pour but de modifier les autres caractéristiques du maïs ;

- (2) Considérant que les analyses de type Southern, utilisant une large gamme d'enzymes de restriction et de sondes spécifiques de l'insert 3272, montrent que les gènes d'intérêt *amy797E* et *pmi* sont présents en un seul exemplaire dans le génome nucléaire du maïs et que la séquence insérée (ADN-T) ne comprend que la construction sans aucun autre élément du plasmide vecteur de transformation ;

Considérant que, bien qu'aucune information ne soit donnée sur la localisation de l'insert dans le génome, l'hérédité de l'insert a été étudiée au cours de 4 générations de rétro-croisements ;

Considérant que l'analyse des séquences de l'insertion et de ses régions bordures montrent que :

- l'ADN-T, en comparaison de la construction portée par le plasmide vecteur, présente une délétion de 23 pb (paire de base) du côté de la bordure 5' et 7 pb du côté de la bordure 3', ces changements ne modifiant pas le cadre de lecture ;
- les 1000 pb de la région 5' et les 986 pb de la région 3' de part et d'autre de l'ADN-T inséré sont bien d'origine végétale (maïs) et sont détectables dans la lignée non génétiquement modifiée ;

Considérant que les résultats de l'analyse bio-informatique, réalisée pour savoir si la construction s'était insérée dans une région fonctionnelle connue du génome du maïs et pour vérifier que de nouvelles ORF (cadre de lecture ouvert) n'ont pas été générées par cette insertion, montrent que :

- la construction ne s'est pas insérée dans un gène connu du maïs,
- l'analyse d'identités de séquences (BLAST) révèlent que de courtes régions, observées dans la région 3' de l'événement 3272, sont homologues d'éléments de régulation de transcription du maïs mais que la probabilité que cette région puisse fonctionner comme un promoteur est très faible car des éléments nécessaires pour la fonction du promoteur sont absents,
- aucune nouvelle ORF n'est mise en évidence tant du côté 5' que du côté 3' de l'insertion ;

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

Considérant que la teneur en protéines AMY797E et PMI a été mesurée par la méthode ELISA dans différents organes (racine, feuille, pollen et grain) prélevés à différents stades de maturité sur deux hybrides portant l'événement 3272 et dans des plantes non-transgéniques ayant le même fonds génétique prises comme plantes témoins ;

Considérant que

- les teneurs en protéine AMY797E mesurées dans le grain aux différents stades de maturité des plantes sont respectivement comprises entre 838 et 1667 µg/g de poids frais (1004-3365 µg/g de poids sec),
- les teneurs en protéine AMY797E mesurées dans les racines, les feuilles, le pollen et la plante entière sont quantifiables uniquement dans la plante entière lorsque le grain en est à un stade pâteux et/ou mûr ou lorsque la plante est sénescente (<0,02 µg/g - 3 µg/g de poids frais), teneurs qui s'expliquent par les teneurs élevées dans le grain,
- les teneurs en protéine AMY797E mesurées dans le pollen sont inférieures à la limite de détection (LD=0,009 µg/g de poids frais),
- les teneurs en protéine PMI sont comprises entre non détecté et 8,5 µg/g de poids frais (non détecté-18,2 µg/g de poids sec) quel que soit le type de tissu analysé et le stade de maturité de la plante (LD=0,001-006 µg/g de poids frais) ;

Considérant que, compte tenu du fait que l'expression du gène de l'alpha-amylase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'albumen, cette expression est préférentielle dans le grain à des stades différents de maturité du grain (stade pâteux, maturité) et lors de la sénescence de la plante ;

Considérant que l'expression de la PMI étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif, cette protéine est détectée dans tous les tissus de la plante et les niveaux de PMI sont en général similaires entre les hybrides à chaque point de prélèvement et pour tous types de tissu ;

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

Considérant que la stabilité génétique de l'insert a été vérifiée par Southern sur 3 générations (BC1 à BC3) ;

Considérant que la stabilité phénotypique a été vérifiée sur 4 générations (BC1, 2, 4 et 5) par la mesure des teneurs en protéines AMY797E et PMI dans le grain et que les résultats montrent que les valeurs moyennes restent constantes pour les deux enzymes traduisant une stabilité de l'expression au cours des générations (1044-1264 µg/g de poids frais pour AMY797E et 6,6-9,3 µg/g de poids frais pour PMI) ;

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

- (7.1-3) Considérant que deux analyses de composition chimique ont été réalisées, l'une, à partir d'échantillons de deux maïs hybrides A1 et B1 portant l'événement 3272 cultivés sur 6 sites (3 répétitions par site) aux Etats-Unis en 2003 comparés à des maïs témoins A2 et B2 ayant le même fonds génétique et l'autre, à partir d'échantillons d'un maïs hybride B3 portant l'événement 3272 comparé à un maïs témoin B4 cultivé sur 7 sites (3 répétitions par site) aux Etats-Unis en 2004.

Considérant que cette analyse a porté sur le fourrage (8 paramètres fourragers et 9 minéraux) et sur le grain pour un ensemble de paramètres dont notamment 10 minéraux, 7 vitamines, 2 caroténoïdes, 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 les résultats montrent que :

- **Composés majeurs** : dans les grains quelques différences sont significatives avec une valeur mesurée dans l'hybride B1 portant l'événement 3272 supérieure à celle mesurée dans le témoin B2 pour la teneur en sucres, en fibres alimentaires, en amidon et en protéines totales. Ces différences ne sont pas observées pour l'hybride A1 comparé à son témoin A2 ni dans l'étude de 2004 sauf pour la teneur en fibre qui est plus élevée dans le témoin B4 que dans l'hybride B3 portant l'événement 3272. Ces différences ne se retrouvent pas dans la plante utilisée comme fourrage ;
- **Minéraux** : aucune différence significative entre les hybrides A1, B1 et B3 et leurs témoins respectifs A2, B2 et B4 n'a été mise en évidence dans le grain ou dans le fourrage ;
- **Acides aminés** : la quantité d'acides aminés libres est toujours significativement supérieure ($p < 0,1\%$) dans l'hybride B1 portant l'événement 3272 que dans le témoin B2 pour tous les acides aminés mais cette différence n'est pas observée dans les hybrides A1 et B3 portant l'événement 3272 comparés à leurs témoins respectifs A2 et B4 ;
- **Acides gras, vitamines, facteurs antinutritionnels et métabolites secondaires** : aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les grains porteurs de l'événement 3272 et les témoins correspondants ;

Considérant que d'une part, ces différences sont sporadiques et observées que pour l'un ou l'autre des hybrides ou sur des plantes cultivées soit en 2003 soit en 2004 et que d'autre part, les teneurs mesurées sont néanmoins comprises dans les limites des tables de composition établies pour le maïs grain au niveau international (OCDE¹), l'ensemble des données présentées conduit à conclure à une équivalence entre les maïs porteurs de l'événement 3272 et les témoins ;

(7.6) **Effet du procédé de traitement**

Principe de l'utilisation de l'alpha-amylase AMY797E dans le procédé de production de l'éthanol

Le maïs 3272 exprimant une alpha-amylase thermostable (AMY797E) dans la graine a été développé pour être utilisé comme source d'alpha-amylase dans la production éthanol broyé à sec. L'amidon contenu dans les graines de maïs est hydrolysé en glucose. Le glucose est ensuite utilisé pour produire de l'éthanol par fermentation. L'amidon contient un mélange d'amylose (chaîne linéaire de glucose) et d'amylopectine (chaîne ramifiée de glucose). L'alpha-amylase catalyse l'hydrolyse de l'amidon par clivage interne de la liaison alpha-1,4-glucosidique de l'amylose et de l'amylopectine en dextrine (fragment d'amidon contenant de 5-50 molécules de glucose), maltose et glucose. Dans le processus de production d'éthanol broyé à sec, une glucoamylase est ajoutée après l'étape de l'alpha- amylase pour compléter l'hydrolyse de la dextrine en

¹ OECD (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti nutrients and secondary plant metabolites. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. ENV/JM/MONO(2002)25

glucose. Le glucose est ensuite utilisé comme substrat par les levures pour produire, par fermentation, de l'éthanol. Après une étape de distillation, trois produits finaux sont obtenus : de l'éthanol, du CO₂ et un résidu de graines solubles et solides. Ce dernier co-produit est communément utilisé dans la nourriture pour animaux.

Considérant que la protéine AMY797E pourrait conserver une activité à l'issue du procédé de fermentation, aucune donnée n'étant fournie sur sa quantité et son activité résiduelle dans les co-produits, il n'est pas possible de vérifier si cette protéine a été détruite ou si elle a perdu son activité dans ces co-produits destinés à l'alimentation animale ;

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) **Evaluation de la sécurité des protéines AMY797E et PMI**

Considérant que les alpha-amylases et la PMI sont naturellement présentes dans la nourriture issue de plantes ou de microorganismes et que :

- l'alpha-amylase AMY797E exprimée par le maïs 3272 montre de grande homologie avec les protéines alpha-amylases présentes chez les bactéries, les archaeas, les plantes et les eucaryotes incluant l'homme ; ces alpha-amylases sont largement utilisées dans les procédés industriels de transformation de l'amidon à des fins alimentaires depuis de nombreuses années sans avoir jamais posé de problèmes de sécurité ;
- la PMI exprimée par le maïs 3272 montre de grande homologie avec d'autres PMI présentes chez de nombreux eucaryotes, notamment des plantes (tabac, pin, légumes et graine de soja) mais aussi le rat, le porc et l'homme, ainsi que chez les prokaryotes (bactéries, levures) ;

Considérant que les séquences des protéines AMY797E et PMI ont été comparées avec celles des protéines répertoriées dans les banques de données, connues pour être toxiques, immunotoxiques ou avoir une activité pharmacologique, et qu'elles ne présentent pas d'homologie de structure avec ces protéines ;

Protéine AMY797E

Considérant que :

- la protéine AMY797E extraite de grain de maïs 3272 présente une activité alpha-amylase de 33 000 U/g de substance et contient 460 mg/g de protéines.
- l'intégrité de l'alpha-amylase AMY797E a été vérifiée par western blot montrant une seule protéine de 50,2 kDa correspondant au poids moléculaire déduit de la séquence d'ADN ;
- l'alpha-amylase AMY797E extraite du maïs n'est pas glycosylée ;

Considérant que :

- l'alpha-amylase AMY797E a été sélectionnée pour sa haute thermostabilité et son activité aux fortes températures² auxquelles elle est utilisée dans le processus d'hydrolyse de l'amidon pour la production éthanol à partir de maïs ;
- l'alpha-amylase est totalement dégradée (vérifié par électrophorèse SDS page et western blot) en 5 minutes par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) ;

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë a été réalisée chez la souris (5 animaux par sexe) par voie orale avec une administration unique de la protéine AMY797E extraite du maïs à la dose de 1511 mg/kg p.c., qu'ont été réalisés l'analyse de paramètres sanguins (nombre d'hématies, globules blancs, hémoglobine, hématocrite, volume des hématies), des tests biochimiques (mesures des activités de la phosphatase alcaline, de l'alanine aminotransférase, de l'aspartate aminotransférase, de la glutamyle transférase, le niveau de créatinine, d'urée, d'albumine, de glucose, de cholestérol, de triglycérides, l'activité de la créatine kinase, le niveau de bilirubine, de sodium, de potassium, et de chlore), la mesure du poids des organes (surrénales, cerveau, épидидymes, cœur, ovaires, reins,

² Cette propriété est identique celle des alpha-amylases microbiennes communément utilisées pour réaliser cette production d'éthanol.

foie avec la vésicule biliaire, rate et testicules) ainsi qu'une analyse histopathologique de 47 organes et tissus ;

Considérant que les résultats montrent que :

- aucune mortalité n'est observée durant l'étude ;
- aucune diminution de la consommation de nourriture n'est observée ;
- le poids des femelles du groupe traité est plus faible (2 %) par rapport au groupe témoin, 8 jours après le gavage, cette diminution n'étant pas observée chez les mâles ;
- les mâles du groupe traité présentent un taux plus élevé de triglycérides (2,01 + 0,28 vs 1,64 + 0,13) par rapport au groupe contrôle ;
- les femelles du groupe traité présentent une activité gamma-glutamyl transférase (4,7 + 1 vs 6,5 + 1,8) et un taux de calcium (2,61 + 0,00 vs 2,8 + 0,13) plus faible que dans le groupe contrôle ;
- les analyses macroscopiques et microscopiques des organes étudiés montrent de petites lésions observées de façon aléatoire dans les groupes témoins et traités ;

Considérant cependant que ces différences étant faibles et observées uniquement dans l'un des sexes et qu'aucun signe clinique significatif n'est observé, l'ensemble de ces données permet de conclure à l'absence d'une éventuelle toxicité, ces résultats confirmant l'innocuité des alpha-amylases déjà observée ;

Protéine PMI

Considérant que :

- la protéine PMI-0198 produite par *E. coli* présente la même séquence en acides aminés que la protéine PMI exprimée dans l'évènement 3272 à l'exception d'une addition de 16 acides aminés en N terminal (13 acides aminés T7-Tag et 3 acides aminés restant du polylinker) ;
- les caractéristiques biochimiques et l'activité enzymatique de la protéine PMI produite par *E. coli* et extraite des feuilles de maïs de l'évènement 3272 ont été comparées et les résultats montrent qu'elles ont le même poids moléculaire apparent en gel SDS PAGE (42,8 Kd pour la PMI exprimée dans le maïs 3272 et 44,4 Kd pour la PMI produit dans *E. coli*) et que leur activité enzymatique spécifique est du même ordre de grandeur (PMI produit par *E. coli* : 53 U/mg PMI ; PMI extraite du maïs 3272 : 97 U/mg PMI) ;
- l'intégrité de la molécule PMI a été vérifiée par western blot montrant qu'une seule protéine de 45 kDa correspondant au poids moléculaire prédit à partir de la séquence d'ADN ;

Considérant que :

- l'activité de l'enzyme PMI-0198 (produit par *E. coli*) est totalement conservée après 30 minutes à 55° C mais elle est presque totalement inactivée (reste 2 % d'activité) après une incubation à 65° C pendant 30 minutes ;
- la protéine PMI-0198 est digérée immédiatement par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) dès le premier temps d'incubation (vérifié par électrophorèse SDS-PAGE et western blot) ;
- la protéine PMI-0198 est totalement dégradée après 2 minutes d'incubation en présence de pancréatine (dégradation protéolytique en fluide intestinal simulé) ;

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë a été réalisée chez la souris (7 mâles et 6 femelles) par voie orale avec une administration de la protéine PMI extraite d'*E. coli* à la dose unique de 3030 mg/kg p.c. (administrée en deux fois à 1 heure d'intervalle) ;

Considérant que les résultats portent sur le poids de différents organes (foie, rate, reins, cerveau et le système gastro-intestinal) et l'observation de la peau, du pelage, de l'activité motrice, du comportement, de la salivation, d'une léthargie, d'un coma et de diarrhée ;

Considérant qu'aucune perte de poids, diminution de la consommation de nourriture et d'anomalies macroscopiques des organes étudiés sont observées, l'ensemble de ces

données permet de conclure à l'absence d'une éventuelle toxicité de cette protéine, ces résultats confirmant l'innocuité de la PMI déjà observée ;

(7.8.4) Etude de toxicité subchronique

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours avec des rats des deux sexes (51 rats mâles et 52 rats femelles) en vue d'étudier l'effet de la consommation de maïs grain 3272 incorporé à hauteur de 10 % et 41,5 % à la ration alimentaire en comparaison avec un maïs témoin ayant le même fonds génétique (taux d'incorporation : 10 % et 41,5 %) ;

Considérant que la teneur en protéines AMY797E et PMI a été mesurée par la méthode ELISA dans les différents régimes :

- ration à 10 % de maïs 3272 : 82 µg/g de poids frais d'AMY797E ; <0,25 µg/g de PMI
- ration à 41,5 % de maïs 3272 : 420 µg/g d'AMY797E ; 1,02 µg/g de PMI
- ration à 10 % de maïs témoin : 0,11 µg/g d'AMY797E ; <LD de PMI
- ration à 41,5 % de maïs témoin : 0,63 µg/g d'AMY797E ; <LD de PMI ;

Considérant que :

- aucun effet significatif n'est observé sur le poids corporel. Seul le groupe de mâles nourris avec la ration contenant 41,5% de maïs 3272 présente un poids significatif plus faible uniquement au 6^{ème} jour d'expérience. Cette différence n'a pas de signification biologique ;
- aucune diminution de la consommation et d'utilisation de la nourriture ne sont observées chez les animaux nourris avec du maïs 3272. Cependant, des consommations ponctuelles plus élevées et une augmentation significative de l'utilisation de la nourriture pendant les quatre premières semaines d'expérience ont été observées uniquement dans le groupe de mâles nourri avec la ration contenant 10 % du maïs 3272, ces variations sont faibles et sans signification biologique ;
- l'hématocrite des mâles et de femelles du groupe nourri avec 10 % de maïs 3272 dans la ration alimentaire est significativement plus élevé que dans le groupe contrôle. Cette différence est faible, observée uniquement dans un des sexes et liée à une valeur particulièrement basse dans le groupe contrôle ;
- l'activité de la thromboplastine est statistiquement plus élevée uniquement dans le groupe de femelles nourri avec une ration contenant 41,5 % de maïs 3272. Cette différence est faible et observée uniquement dans l'un des sexes ;
- les femelles nourries avec la ration alimentaire contenant 41,5 % de maïs 3272 présentent un taux plus élevé de créatine kinase par rapport au groupe contrôle.
- les mâles du groupe nourri avec une ration contenant 10 % de maïs 3272 présentent une concentration en sodium plus élevée et une concentration en chlore plasmatique plus faible que dans le groupe contrôle ;
- l'analyse clinique montre aucune pathologie. Le poids des organes n'est pas modifié. Les analyses macroscopiques et microscopiques des organes étudiés montrent de petites lésions observées de façon aléatoire dans les groupes contrôles et traités mais aucune anomalie observée est attribuable au maïs 3272 ;

Considérant que les différences enregistrées entre les rats nourris avec du maïs 3272 et les rats nourris avec du maïs témoin ne s'observent que chez un seul sexe et pour une seule dose, qu'elles sont généralement dans les limites des variations spontanées de ces paramètres et qu'il n'apparaît pas, par ailleurs, d'événements convergents laissant supposer une polarité toxique particulière, en conséquence, on peut conclure que le traitement par le maïs 3272 exprimant l'alpha-amylase et la protéine PMI est sans effet toxique chez le rat exposé pendant 90 jours via l'alimentation ;

(7.9) Allergénicité

Considérant que :

- la protéine AMY797E extraite du maïs n'est pas glycosylée ;
- la protéine PMI est instable à la chaleur et les protéines AMY797E et PMI sont rapidement dégradées *in vitro* en milieu gastrique simulé,

- le gène codant la protéine AMY797E est issu de *Thermococcus/Pyrococcus* et le gène codant la protéine PMI est issu d'*E. coli*, ces deux microorganismes n'étant pas connus pour être une source d'allergène ou être à l'origine d'allergie ;

Considérant que la recherche d'homologie de séquence des acides aminés des protéines AMY797E et PMI (comparaison de séquence de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes a mis en évidence que :

- une homologie de séquence de la protéine AMY797E avec la protéine Per a3 mais dont les 3 épitopes à l'origine des effets allergènes de la protéine Per a3 ne recouvrent pas la séquence identifiée dans la protéine AMY797E ;
- une homologie de séquence de la protéine PMI avec la protéine allergène alpha-parvalbumine de grenouille. Afin de vérifier l'absence d'effet allergène de la protéine PMI, celle-ci a été mise en contact avec un sérum de patient présentant des IgE induit par l'alpha-parvalbumine et les résultats montrent l'absence de réaction croisée avec cette protéine allergène ;

Considérant que, compte tenu de l'ensemble de ces éléments, le maïs 3272 n'est pas susceptible de présenter un potentiel allergénique lié à ces deux protéines ; cependant, une vérification de l'absence de réaction croisée de la protéine AMY797E avec le sérum de patient allergique à l'alpha-parvalbumine aurait permis de conforter cette position ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et de 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 49 jours avec 50 à 60 % de maïs 3272 en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique et une variété de maïs commerciale (900 poulets mâles et femelles répartis en 3 traitements) ;

Considérant que la teneur en protéines AMY797E et PMI a été mesurée dans les différentes rations et que ces teneurs sont de 864-1670 µg/g pour la protéine AMY797E, 0,77-2,12 µg/g pour la protéine PMI dans le maïs 3272 et au maximum de 43 µg/g de AMY797E dans le maïs témoin ; les protéines AMY797E et PMI ne sont pas détectables dans la variété commerciale ;

Considérant que l'analyse de composition du grain de maïs 3272 donné aux animaux confirme l'équivalence en substance démontrée dans l'étude de composition (voir 7.1-3) ;

Considérant que :

- une différence significative est observée sur la croissance pondérale entre les mâles et les femelles démontrant la parfaite réalisation de l'expérimentation ;
- les paramètres de performances et de rendement sur carcasse mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs 3272 ne sont pas différents significativement de ceux qui sont mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs témoin ou de la variété commerciale ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à la fois à une équivalence nutritionnelle du maïs hybride 3272 avec son témoin non génétiquement modifié, ainsi qu'à une absence de toxicité de ce maïs pour le poulet, et partant pour l'homme,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que ce maïs n'étant pas destiné à être consommé par l'homme, au regard notamment des données de composition chimique, de toxicité et de l'étude d'alimentarité chez l'animal cible, la consommation sporadique de produits dérivés des variétés de maïs portant l'événement de transformation 3272 ne présenterait pas de risque sanitaire pour l'homme.

Concernant la consommation des co-produits issus de la production d'éthanol à partir de variétés de maïs portant dans l'événement de transformation 3272 destinés aux animaux, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que, pour s'assurer que ces co-produits présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les co-produits issus d'un maïs conventionnel, il conviendra que des données soient fournies sur la quantité et l'activité résiduelle de la protéine AMY797E dans ces co-produits.

Pascale BRIAND

Mots clés : OGM, maïs, 3272, alpha-amylase, alimentation animale