

Maisons-Alfort, le 20 novembre 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 MON 89034 x NK 603 résistant à des insectes et 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 30 août 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 MON 89034 x NK 603 résistant à des insectes et 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-NL-2007-38).

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 États-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 novembre 2007, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) **Information générale**

Cette demande de mise sur le marché concerne le maïs MON 89034 x NK 603, obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifié : le maïs 89034 portant deux gènes codant la protéine Cry1A.105, toxique pour la pyrale (*Ostrinia nubilalis* ou *corn borer*), le ver du cotonnier (*Spodoptera* ou *fall army worm*) et la noctuelle ipsilon (*Agrostis ipsilon* ou *Black cut worm*), et la protéine Cry2Ab2 toxique pour la chenille des épis de maïs (*Helicoverpa zea* ou *corn earworm*), et le maïs NK 603 portant les gènes *cp4epsps* et *cp4epsps L214P* conférant à la plante la tolérance à un herbicide, le glyphosate.

Les maïs portant l'événement 89034 ont été évalués par l'Afssa et ont fait l'objet d'un avis (avis du 20 novembre 2007).

Les maïs portant l'événement NK 603 ont été évalués par l'Afssa et ont fait l'objet d'un avis favorable (avis du 21 février 2003 et 13 janvier 2004) au titre du règlement (CE) n° 258/97. Ils ont également été évalués par l'AESA avec un avis favorable [The EFSA Journal (2003) 9, 1-14] en vue de leur mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 258/97. Les maïs portant l'événement de transformation NK 603 sont autorisés pour la consommation humaine et animale et la culture (Décision de la Commission 2004/643/CE et 2005/448/CE).

Le présent avis s'appuie sur les évaluations déjà réalisées pour ces deux lignées et présentées dans les avis de l'Afssa et de l'AESA cités ci-dessus.

(C) Informations relatives à la modification génétique

- (1) Considérant que le maïs MON 89034 x NK 603 a été obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifié MON 89034 et NK 603 et qu'aucune autre modification génétique n'a été introduite dans ce maïs. Il comporte les deux événements de transformation suivants apportés par les lignées parentales :

Événement MON 89034

L'événement MON 89034 résulte de la transformation d'embryons immatures de maïs avec une souche désarmée d'*Agrobacterium* (souche ABI) portant le vecteur de transformation PV-ZMIR245. L'ADN-T contient les séquences (optimisées dans le contexte végétal) qui codent et régulent l'expression des gènes *cry1A.105* et *cry2Ab2* :

- **Cassette *cry1A.105*** : le gène *cry1A.105*, est sous le contrôle d'une part du promoteur P-e35S porteur de 2 séquences "enhancer" (origine : virus de la mosaïque du chou fleur), suivi de la séquence leader *L-Cab* du blé et de l'intron (*I-ract1*) du riz et d'autre part de la séquence de terminaison T-*Hsp17* issue du blé ;
- **Cassette *cry2Ab2*** : le gène *cry2Ab2* (origine : *Bacillus thuringiensis*), est précédé par la séquence TS-SSU-CTP du blé qui code pour un peptide d'adressage dans les chloroplastes. Le gène *cry2Ab2* est sous le contrôle d'une part du promoteur 35S issu du virus du vers de la figue (*P-FMV*), du premier intron du gène de la protéine Hsp70 (*I-Hsp70*), et d'autre part de la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthétase, NOS 3' d'*Agrobacterium tumefaciens* (T-nos).

Événement NK 603

L'événement NK603 résulte de l'insertion de deux gènes en tandem permettant l'expression de deux protéines CP4 EPSPS et CP4 EPSPS L214P impliquées dans la tolérance au glyphosate, le premier gène est contrôlé par le promoteur de l'actine de riz, le second par le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que les analyses de type Southern, utilisant une large gamme d'enzymes de restriction et de sondes spécifiques des inserts MON 89034 et NK 603, montrent que les inserts présents chez l'hybride correspondent bien aux inserts hérités de chacun des parents, que la structure moléculaire des inserts tels que décrits chez les parents est préservée chez l'hybride obtenu par croisement conventionnel et que les inserts sont situés dans le génome nucléaire de l'hybride à des loci différents ;

Considérant que la présence de ces inserts chez l'hybride a été confirmée par analyse Southern, que les inserts sont situés sur des chromosomes différents du génome nucléaire et que les analyses de ségrégation de ces événements suivent les lois de la génétique mendélienne ;

Considérant que, comme l'hybride a été obtenu de manière conventionnelle, il n'a pas été fait appel à une autre modification génétique additionnelle (transgène). Aussi, il est hautement probable que l'hybride a conservé les caractéristiques de chacune des lignées parentales. Ainsi, les caractéristiques moléculaires de l'ADN introduit, des régions bordures de chacune des insertions doivent se retrouver chez l'hybride ;

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

Considérant que la teneur en protéines *Cry1A.105*, *Cry2Ab2* et CP4 EPSPS a été estimée par ELISA dans différents tissus, notamment les jeunes feuilles (stade végétatif 21 à 29 jours après la plantation), la plante entière (stade végétatif 100 à 120 jours après la plantation), le pollen et le grain, prélevés à différents stades de maturité sur des plantes cultivées sur 5 sites différents en Argentine au cours de la saison 2004-2005 ;

Considérant que les teneurs moyennes en protéines *Cry1A.105*, *Cry2Ab2* et CP4 EPSPS dans ces différents tissus provenant d'un maïs hybride MON 89034 x NK 603 sont les suivantes (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS mesurées dans MON 89034 x NK 603, comparées aux teneurs en protéines mesurées chez les parents MON 89034 et NK 603

	Cry1A.105		Cry2Ab2		CP4 EPSPS	
	MON 89034 x NK 603	MON 89034	MON 89034 x NK 603	MON 89034	MON 89034 x NK 603	NK 603
µg/g poids frais (écart-type), [étendue]						
Jeune feuille	31 (11) [11-50]	85 (21) [56-130]	20 (6,9) [4,9-31]	29 (6,8) [19-43]	34 (7,0) [18-44]	31 (2,9) [28-38]
Plante entière	8,4 (2,5) [2,9-12]	14 (3,6) [8,3-24]	9,3 (2,8) [4,7-15]	12 (4,0) [6,5-18]	21 (4,3) [16-31]	18 (4,5) [11-28]
Pollen	7,0 (1,2) [5,3-9,5]	6,4 (1,5) [3,8-8,8]	0,48 (0,14) [0,36-0,86]	0,34 (0,08) [0,21-0,47]	280 (99) [140-450]	230 (53) [150-340]
Grain	2,6 (0,36) [2,3-3,7]	5,1 (0,67) [4,1-6,0]	1,0 (0,15) [0,80-1,3]	1,1 (0,31) [0,67-1,8]	7,0 (1,4) [5,0-9,7]	5,8 (1,6) [3,7-8,2]

Considérant que le niveau d'expression des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS peut être considéré comme comparable à celui mesuré respectivement chez chacun des parents ;

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

Considérant que la présence des inserts dans l'hybride MON 89034 x NK 603 a été vérifiée par Southern, que la stabilité phénotypique a été vérifiée notamment par dosage des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS, sur plusieurs générations et que les données obtenues confirment que MON 89034 x NK 603 porte chaque insert en un seul locus au niveau du génome nucléaire, qu'ils sont stables et qu'ils suivent les lois d'une ségrégation mendélienne ;

(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 les événements MON 89034 et NK 603 cultivé sur 5 sites (3 répétitions par site) en Argentine en 2004-2005 et d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique cultivé conjointement avec le maïs hybride MON 89034 x NK 603 ;

Considérant que l'analyse de composition pour le grain porte sur un ensemble de paramètres dont notamment 8 minéraux, 5 vitamines, 18 acides aminés, 9 acides gras, 4 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels potentiels (acide férulique, acide paracoumarique, acide phytique, raffinose) ;

Considérant que les résultats montrent que l'on observe quelques différences significatives pour certains paramètres mineurs selon les sites pris individuellement ou pour l'ensemble des sites combinés ;

Considérant cependant que d'une part, ces valeurs mesurées restent dans la limite des fourchettes des tables de composition établies pour le maïs grain au niveau international (OCDE 2002¹), et que d'autre part, il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en composés majeurs du maïs grain comparées aux teneurs mesurées dans le maïs témoin, l'ensemble des données présentées conduit à conclure à une équivalence en substance entre le maïs hybride MON 89034 x NK 603 et son témoin, excepté la présence de très faibles quantités de protéines recombinantes ;

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 25 (2002).

(7.4) Analyse comparative des caractères agronomiques

Considérant que l'analyse des caractères agronomiques et phénotypiques (14 paramètres) de plantes MON 89034 x NK 603 cultivées sur 5 sites en 2004 comparés à ceux de plantes témoins montre qu'il n'y a pas de différences entre les plantes génétiquement modifiées et les plantes témoins, excepté pour les caractères introduits (tolérance au glyphosate et résistance à des insectes) ;

(7.8) Toxicologie**(7.8.1) Evaluation de la sécurité des protéines Cry1A.105, Cry2Ab2, CP4 EPSPS**

Considérant que :

- une étude de toxicité aiguë par voie orale de la protéine Cry1A.105, synthétisée chez *E. coli*, a été réalisée chez la souris selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales et qu'à la dose maximale administrable (2072 mg/kg) en 2 fois, à 4 heures d'intervalle, aucun effet traduisant un effet toxique sur l'ensemble des paramètres étudiés n'est observé ;
- une étude de toxicité aiguë par voie orale réalisée avec la protéine Cry2Ab2, synthétisée chez *E. coli*, montre qu'à la dose maximale administrable de 2198 mg/kg en 2 fois, à 4 heures d'intervalle, on n'observe aucun effet délétère sur les animaux testés ;
- une étude de toxicité aiguë par voie orale la protéine CP4 EPSPS, synthétisée chez *E. coli*, a été réalisée chez la souris montre qu'à la dose maximale administrée de 817 mg/kg p.c. on n'observe aucun effet délétère sur les animaux testés ;

Considérant que les protéines Cry1A.105, Cry2Ab2 et CP4 EPSPS ne présentent pas d'identité de structure avec des protéines, répertoriées dans des bases de données internationales, connues pour leurs propriétés toxiques, immunotoxiques ou leur activité biologique ou pharmacologique chez l'homme et les animaux ;

(7.8.2) Etude de la toxicité subchronique**Maïs MON 89034**

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 (20 animaux de chaque sexe par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation d'un maïs grain MON 89034, incorporé à hauteur de 11 % ou 33 % dans la ration alimentaire en comparaison avec un maïs témoin ayant le même fonds génétique (incorporé à hauteur de 33 %) ;

Considérant que, dans son avis du 20 novembre 2007, l'Afssa a estimé qu'elle ne pouvait pas se prononcer sur la sécurité sanitaire des produits dérivés des variétés de maïs portant l'événement de transformation MON 89034 en l'absence d'explications complémentaires relatives aux altérations histologiques rénales mentionnées dans cette étude ;

Maïs NK 603

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique, réalisée durant 90 jours en 2001 sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain NK 603 en comparaison avec un maïs ayant le même fonds génétique et 6 autres variétés de maïs, n'a pas mis en évidence de différences significatives pour l'ensemble des paramètres observés entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique (avis de l'Afssa du 13 janvier 2004) ;

Maïs MON 89034 x NK 603

Considérant qu'aucune étude de toxicité subchronique n'a été réalisée chez le rat avec le maïs hybride MON 89034 x NK 603 ;

Considérant que

- aucun effet toxique ou délétère chez l'animal de laboratoire n'a été mis en évidence pour les 3 protéines d'intérêt (voir 7.8.1),

- les niveaux d'expression des protéines d'intérêt, compte tenu des écart-types observés, n'étant pas modifiés chez l'hybride comparés aux niveaux mesurés chez les parents, un tel élément est en faveur d'une absence d'interaction entre les événements de transformation,
- l'étude d'alimentarité réalisée chez le poulet permet de conclure à l'équivalence nutritionnelle du maïs hybride avec son témoin (voir 7.10),
- l'étude de toxicité subchronique de 90 jours réalisée chez le rat avec le maïs parental NK 603 n'a montré aucun effet délétère chez l'animal,
- l'étude de toxicité subchronique de 90 jours réalisée chez le rat avec le maïs parental MON 89034 a mentionné des altérations histologiques rénales qui nécessitent d'apporter des explications complémentaires sur la différence d'apparition des calculs dans la vessie entre les données historiques (0,49 %) et l'incidence de 10 % observée au cours de cette étude chez les animaux femelles du groupe à la forte dose de MON 89034,

il n'est pas possible, en l'absence de ces explications complémentaires, de considérer que ces éléments sont suffisants pour démontrer la non toxicité des produits dérivés de l'hybride MON 89034 x NK 603 ; une étude de toxicité 90 jours réalisée avec un maïs hybride portant ces événements de transformation aurait permis de s'assurer que les altérations histologiques rénales mentionnées n'étaient pas liées à la modification génétique introduite dans le maïs MON 89034 ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que la recherche d'identité de séquence des acides aminés des protéines Cry1A.105², Cry2Ab2 et CP4 EPSPS (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités ;

Considérant que :

- la protéine Cry1A.105 (produite par *E. coli*) est digérée à 99,3 % en 30 secondes (vérifié par électrophorèse SDS-PAGE et western blot) par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) et totalement digérée en 30 minutes;
- la protéine Cry1A.105 est dégradée à 99,5 % après 5 minutes d'incubation en présence de pancréatine (dégradation protéolytique en fluide intestinal simulé) et totalement dégradée en 24 heures ;

Considérant que :

- la protéine Cry2Ab2 (produite par *E. coli*) est digérée à 99,4 % en 30 secondes (vérifié par électrophorèse SDS-PAGE et western blot) par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) et totalement digérée en 2 minutes ;
- la protéine Cry2Ab2 est dégradée à 99,7 % après 15 minutes d'incubation en présence de pancréatine (dégradation protéolytique en fluide intestinal simulé) et totalement dégradée en 24 heures ;

Considérant que la protéine CP4 EPSPS, soumise à des tests de digestion protéolytique *in vitro*, est dégradée en moins de 15 secondes (modèle fluide gastrique simulé) et en moins de 10 minutes (modèle fluide intestinal simulé) ;

Considérant :

- l'absence de glycosylation des protéines Cry1A.105 Cry2Ab2 et CP4 EPSPS d'origine microbienne ou extraites de la plante,
- la capacité de ces protéines à être dégradées ou digérées *in vitro* en milieu gastrique ou intestinal simulé,
- l'absence d'identité des séquences des acides aminés de ces protéines avec des séquences de protéines connues pour être allergènes,

² Cry1A.105 est une protéine chimérique dont la séquence présente une identité de 93,6 % avec la protéine Cry1Ab, 90,0 % avec la protéine Cry1Ac et 76,7 % avec la protéine Cry1F.

- la très faible teneur en protéines finales par rapport au poids frais des grains de maïs (0,003 % pour Cry1A.105, 0,001 % pour Cry2Ab2 et 0,008 % pour CP4 EPPSPS dans le grain de maïs),

l'existence d'un potentiel allergénique de ces protéines peut ne pas être suspectée ;

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 800 poulets (5 mâles et 5 femelles, 10 répétitions par traitement et par sexe) nourris 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 MON 89034 x NK 603 (58 et 59 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique et 6 variétés commerciales de maïs ;

Considérant que l'équivalence de composition chimique entre le maïs MON 89034 x NK 603 et les maïs témoin et contrôles et les teneurs en 19 mycotoxines³ et 4 pesticides des rations ont été vérifiées ;

Considérant que les observations ont porté sur 8 paramètres zootechniques, 12 caractéristiques de découpe et 3 données de composition des muscles et que le taux de mortalité enregistré (1 à 2 %) au cours de l'expérimentation est non lié au traitement ;

Considérant que les résultats, après analyse statistique, montrent qu'on observe :

- aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le maïs MON 89034 x NK 603 et le maïs témoin ou les variétés commerciales testées pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux ;
- aucune différence, à l'issue de l'expérience, en ce qui concerne les données relatives aux caractéristiques de la carcasse (rendement à l'abattage, qualité de la viande) ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs grain MON 89034 x NK 603 avec son témoin non génétiquement modifié,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que, compte tenu des réserves faites sur l'étude de toxicité 90 jours avec le maïs MON 89034, elle ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire des produits dérivés des variétés de maïs portant l'évènement de transformation MON 89034 x NK 603.

L'Afssa rappelle également la nécessité de fournir des informations complémentaires qui permettent de lever toute ambiguïté sur le fait que l'intégration de l'évènement MON 89034 s'est faite dans une région fonctionnelle ou non du génome du maïs (avis de l'Afssa du 20 novembre 2007).

Pascale BRIAND

³ Il convient de noter que le taux en désoxynivalénol et de fumonisines B1 et B2 est significativement plus faible dans le maïs MON 89034 que dans le maïs témoin.