



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 12 mars 2009

AVIS
de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
sur l'étude de Velimirov et al. « effets biologiques de la consommation du
maïs transgénique NK603xMON810 dans des études de reproduction à long
terme chez la souris ».

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) s'est auto-saisie le 21 novembre 2008 suite à l'étude réalisée par les Drs Velimirov et Binter et le Pr Zentek de l'Université de médecine vétérinaire de Vienne (VUW) à la demande du ministère Autrichien de la Santé.

Les maïs NK603xMON810 sur lesquels ont été menés l'étude ont été évalués par l'AFSSA en 2004 et 2005 (avis du 14/05/04 et du 13/09/05).

Par ailleurs, l'Afssa a été saisie le 24 novembre 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, afin qu'elle indique si cette étude est susceptible de remettre en cause les conclusions de l'avis du 13 septembre 2005.

Méthode d'expertise de l'auto-saisine

Le Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » a examiné cette auto-saisine lors de ses réunions du 18 décembre 2008 et du 15 janvier 2009 au cours desquelles il a souhaité en outre auditionner deux experts externes.

Présentation de l'étude

Ces travaux visent à mettre en évidence des effets éventuels à long terme sur la fonction de reproduction, dans des conditions d'exposition maximale :

- 1- étude sur plusieurs générations (MGS)
- 2- étude de la reproduction à long terme sur la génération F1 (LTS)
- 3- étude de la reproduction par élevage continu (RACB)

Dans ces études, trois groupes de souris sont nourries avec des aliments comportant chacun 33% de farine de maïs provenant :

- soit du maïs transgénique NK603xMON810
- soit d'un maïs témoin, dit isogénique, de même fonds génétique sans les transgènes
- soit d'une variété de maïs d'origine autrichienne et non transgénique.

Les seules différences significatives entre les groupes, identifiées par les auteurs, sont observées sur la reproduction dans l'étude RACB.

Après consultation du CES « biotechnologie », l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

Remarques générales sur l'étude et la mise œuvre de la démarche expérimentale

Avant de présenter les conclusions de l'analyse, l'Afssa formule les remarques suivantes :

1- Il s'agit d'une étude dont les résultats n'ont pas été soumis aux critiques du comité de lecture d'une revue scientifique.

2- Cette étude ne fait pas état d'un suivi des Bonnes Pratiques de Laboratoire pour les expérimentations mises en œuvre.

3- Le protocole (RACB) mis en œuvre par cette équipe ne respecte pas le protocole officiel défini par les équipes du National Toxicology Program¹. Ainsi sont absentes de l'étude, les analyses du

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

¹ Chaplin RE and Sloane RA, 1996, Reproductive assessment by continuous breeding : Evolving study design and summaries of eighty-eight study. Environmental Health and Perspectives, 102, supplement 2 : 1-7.

comportement sexuel, les dosages des hormones de la reproduction et les analyses histologiques des ovaires et des testicules.

4- Contrairement aux recommandations des lignes directrices «*Guideline on risk assessment of medicinal products on human reproduction and lactation, from data to labelling* - EMEA 2005» les données historiques de la souche de souris utilisée dans l'expérience ne sont pas renseignées.

5- Le choix d'une population d'animaux outbred (*strain OF1*) n'apparaît pas suffisant pour démontrer un effet sur les fonctions de reproduction. Les populations de souris outbred ne sont pas génétiquement définies à l'échelon individuel et, dans ces conditions, la structure génétique d'un lot de taille limitée (comme c'est ici le cas) peut être très variable.

De plus, dans le cas où l'analyse porte sur plusieurs générations, le coefficient de consanguinité peut augmenter au cours de l'expérience de manière aléatoire et non uniforme entre les trois groupes expérimentaux. Le caractère "fécondité" peut évidemment en être affecté.

Dans le cas présent, les expérimentateurs auraient dû utiliser des lignées de souris consanguines² ou augmenter de façon importante le nombre d'animaux par groupe.

6- L'origine des maïs utilisés comme comparateur isogénique (ISO) n'est pas clairement définie, ces maïs ne sont plus commercialisés.

7- Le choix d'un taux unique de 33% de maïs grain dans la ration est insuffisant alors qu'il est préconisé d'utiliser deux doses dans le test toxicologique à 90 jours chez le rat³ en vue de montrer un effet dose.

8- L'étude ne fournit pas les données brutes des différentes expérimentations. Il n'est donc pas possible à un expert externe de refaire une analyse statistique complète des résultats expérimentaux. L'accès à ces données a été demandé, via l'Agence de sécurité des aliments Autrichienne, au ministère de la santé Autrichien commanditaire de l'étude. Cette demande n'a pas pu être satisfaite.

De plus, la description des conditions de l'expérimentation animale telles que définies dans le « Standard Operation Protocole » est absente de l'étude.

9- Plusieurs erreurs de calcul ont été identifiées dans les tableaux 36 (page 39) et 59 (page 77). Les commentaires sur les conséquences de ces erreurs sont rapportés dans les paragraphes qui suivent.

Commentaires sur les résultats de l'expérience

Analyse de la composition chimique des grains de maïs et des régimes

L'analyse de la composition chimique des différents maïs employés dans l'expérience fait apparaître des différences non négligeables sur la concentration en zinc, en cuivre, en vitamines A et E. Or, certains de ces composés sont décrits dans la littérature comme impliqués dans la fertilité des animaux⁴.

L'analyse des composés chimiques est insuffisante et ne suit pas les recommandations de l'OCDE 2002⁵ spécifiques au maïs.

Des données sur les facteurs antinutritionnels et toxiques du maïs (acide phytique, acide paracoumarique, furfural et inhibiteurs de trypsine) ainsi qu'une analyse statistique des données, auraient été nécessaires pour conclure à une équivalence en substance des différents groupes de grains utilisés dans les expérimentations.

Nous observons également que les échantillons de grain ISO ne sont pas purs. En effet, la présence du promoteur 35S a été mise en évidence par détection PCR dans les lots de grains ISO

² Chia R, Achilli F, Festing MF W and Fisher EMC. 2005 The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*, 37, 1181 – 1186.

³ EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials, 2008, Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials, *Food Chem Toxicol.* 46, 1, S2-70.

⁴ Telliman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M and Roit B, 2000, Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men, *Environmental Health Perspectives*, 108, 1.

⁵ OCDE, 2002, Consensus document on composition and consideration for new varieties of maize (*Zea mays*). Keyfood nutrients and secondary metabolites.

alors que ce promoteur est spécifique du transgène, donc des grains GM (tableau 14 p28). Enfin, les teneurs en mycotoxines et en microorganismes sont variables d'un lot à l'autre. Ces différences et irrégularités dans la préparation des échantillons peuvent avoir des effets sur la reproduction des souris. Or, elles ne font l'objet d'aucun commentaire de la part des auteurs.

Etude sur plusieurs générations (MGS)

L'étude porte sur quatre générations successives (F1 à F4) à partir des parents F0. Dans une première analyse, les animaux ayant reçu, à volonté, un régime contenant du maïs GM sont comparés à ceux ayant reçu un maïs isogénique non-GM. Une deuxième analyse portant sur les mêmes paramètres consiste à comparer les animaux ayant reçu le maïs isogénique non-GM à ceux ayant reçu un maïs conventionnel (variété autrichienne).

Les auteurs ont établi des comparaisons statistiques sur des sous groupes définis par la taille de la portée (supérieure ou inférieure à 8 souriceaux). Aucun élément n'est apporté pour justifier ce seuil de 8.

Les résultats présentés dans le tableau 36, sont fondamentaux dans cette étude car ce sont eux qui servent de base à l'argumentation et aux conclusions. Ils sont critiquables sur plusieurs points :

- ce tableau contient des erreurs de calcul (sixième colonne 1.20 au lieu de 2.95),
- les auteurs ont calculé le nombre moyen de souriceaux à la naissance rapporté à l'ensemble des couples sans tenir compte du nombre de mises bas du groupe (certain couple n'ont pas donné de portée). Il eut fallu utiliser comme dénominateur le nombre de portées au lieu du nombre de couples mis en expérience.
- il montre un taux parfois élevé (18 et 24%) de mortalité entre la naissance et le sevrage dans tous les groupes. Ceci est anormal avec des souris OF1 et aurait dû être expliqué.
- Le nombre de souriceaux (nés et/ou sevrés) par portée diminue à mesure que les générations avancent. Le faible taux de reproduction des deux groupes ISO et GM à la 4^{ème} génération, 27% et 36% respectivement, réduit l'échantillon déjà faible en début d'expérience.
- Les données présentent une très grande variabilité, ce qui est attendu avec des lignées outbred.

Les analyses histologiques ne montrent aucune différence entre la structure des organes des souris nourries avec un aliment contenant le maïs GM et celle des organes des souris témoin. Ces résultats confirment l'absence d'effet d'une alimentation contenant un maïs génétiquement modifié sur la structure de ces organes.

L'étude du transcriptome est complète et bien conduite. L'analyse de la fonction des gènes, ayant un différentiel d'expression, dans le but d'identifier les voies métaboliques modifiées par le traitement est intéressante. Cependant, il est difficile de relier une différence du transcriptome des cellules intestinales à un régime alimentaire et de conclure à un effet de la seule présence du maïs GM dans le régime. De plus, ces résultats ne sont pas liés à la fonction de reproduction.

Etude de longévité reproductive sur la génération F1 (LTS)

Dix femelles par groupe de la génération F1 issues de parents ayant reçu le maïs GM versus le maïs isogénique ont été alimentées tout au long de leur vie avec un régime identique à celui des parents. Aucune différence statistiquement significative n'est observée sur la courbe de survie en raison de l'effectif réduit et de l'occurrence d'événements pathologiques (cancer) associé au fonds génétique utilisé (OF1) et donc indépendant du traitement.

Etude de reproduction par élevage continu (RACB reproductive assessment by continuous breeding)

24 couples de souris de la génération F0 ont été constitués et les souris ont été suivies durant 4 portées successives. Les animaux nourris avec l'aliment contenant le maïs GM (33%) sont comparés à ceux nourris avec le maïs isogénique non transgénique.

Contrairement au protocole initial RACB, où les souriceaux sont sacrifiés à la naissance, ils sont maintenus avec les parents pendant 3 semaines jusqu'au sevrage excepté ceux de la dernière portée. Or, avec ce type de lignées outbred, les mâles deviennent agressifs avec l'âge et les femelles sont susceptibles de cannibaliser leurs souriceaux. Ces faits connus ne sont pas documentés.

Selon les auteurs, cette étude est la seule à mettre en évidence, un effet de l'alimentation à base de maïs GM sur la 3^{ème} et 4^{ème} portée de souris (tableau 59 page77). Le tableau 59 comporte cependant une erreur de calcul sur la ligne « nombre de souriceaux par portée » dans le groupe GM de la 4^{ème} portée ; ce nombre n'a, en effet, pas été divisé par le nombre de portées réussies mais par le nombre de couples de souris mis dans l'expérience. Cette erreur induit une analyse statistique et une interprétation fausses. Ceci remet en cause les principales conclusions de l'étude.

Le tableau 1, ci dessous, présente les données recalculées.

Number of pups at birth/pair	1st litter		2nd litter		3rd litter		4th litter	
	ISO	GM	ISO	GM	ISO	GM	ISO	GM
<i>Données de l'étude</i>	9,00	8,22	10,83	10,65	11,92*	9,68*	11,38*	8,21*
<i>Données corrigées</i>	9,00	8,22	10,83	10,65	11,92*	9,68*	11,38	9,85

Tableau 1 : correction du tableau 59 page 77. * significativement différent (p<0.05).

Après correction, nous observons que les différences entre les traitements se réduisent. La différence entre le groupe GM et le groupe ISO n'est plus significative pour la 4^{ème} portée⁶.

En outre, dans cette expérience RACB, on observe une mortalité des souriceaux plus faible pendant la période d'alimentation lactée dans les groupes GM que dans les groupes ISO en général (sauf pour 2^{ème} portée), ce qui est contraire aux conclusions des auteurs.

Nous notons également un nombre non négligeable de couples qui ne produisent pas de souriceaux dès le début de l'expérience. Les cas de stérilité observés chez les femelles ne sont pas analysés sur le plan pathologique. Il était indispensable de faire une autopsie dans chaque cas pour déterminer les raisons de ces stérilités. Ce qui comprend une analyse minutieuse de l'appareil génital (histologie de l'ovaire, décompte des corps jaunes, etc...) et une analyse des paramètres endocriniens (mesure des stéroïdes sexuels dans le sang). L'imperforation vaginale est un phénomène très courant chez la souris qui se détecte très simplement. Elle est évidemment incompatible avec un accouplement et une gestation. Il est surprenant que des couples de souris non consanguines restent sans produire de descendance et qu'aucune explication n'en soit donnée.

Nous remarquons, comme dans l'expérience précédente, une mortalité importante entre la naissance et le sevrage, surtout pour la 4^{ème} portée (14% et 12%). Aucune explication n'est apportée sur ce fait.

La fluctuation observée du nombre de souris nées au sein d'un groupe montre la variabilité inter-groupe liée au caractère « outbred » des souris. Cela suggère plutôt un effet de l'environnement et souligne bien l'intérêt de travailler avec un plus grand nombre de couples d'animaux.

Sur la base des résultats de l'étude RACB, les auteurs concluaient sur l'existence d'un lien entre l'alimentation à base de maïs GM et la reproduction des souris. Or après corrections, certaines des différences statistiques qui avaient été mises en évidence ne sont plus significatives. Ceci remet en cause les principales conclusions qui, en outre, auraient dû être confirmées par des études complémentaires telles que :

- 1) une étude similaire dans laquelle les couples sont croisés pour démontrer si la diminution de fertilité était liée au mâle ou à la femelle comme l'exige le protocole RACB ;
- 2) une étude hormonale comme le dosage de la LH, la FSH, le GnRH, la prolactine et la leptine ainsi que de la testostérone et des œstrogènes, pour tenter de comprendre les causes de la baisse de fertilité ;
- 3) une analyse histologique des ovaires et du tractus génital des femelles ;

⁶ Le traitement statistique des valeurs de la 4^{ème} portée a été refait par nos experts en prenant en compte les valeurs de l'erreur standard présentées dans l'étude.

- 4) une analyse statistique des résultats par analyse de variance permettant de tester les interactions « traitement x ordre de portée ».

Conclusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que les données présentées dans cette étude ne permettent pas de conclure qu'une alimentation à base de maïs NK603xMON810 affecte les fonctions de reproduction chez la souris. Elles ne remettent pas en cause la sécurité sanitaire de ces maïs et de leurs produits dérivés et donc les conclusions de l'avis du 13 septembre 2005.

Mots clés : maïs NK603, maïs MON810, souris, reproduction.

**La Directrice Générale
Pascale BRIAND**