

Maisons-Alfort, le 4 avril 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 88017 tolérant à un herbicide et 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 25 janvier 2007 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié MON 88017 tolérant à un herbicide et 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° 1829/200 (dossier n°EFSA/CZ/2005/27).

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 15 mars 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 génétiquement modifié MON 88017 rendu tolérant au glyphosate par l'introduction d'un gène codant la protéine CP4 EPSPS et résistant à certains coléoptères (*Diabrotica* spp) par l'introduction d'un gène codant la protéine Cry3Bb1. Cette demande porte sur le grain et ses produits dérivés destinés à la consommation humaine et animale. Elle ne concerne pas la mise en culture de MON 88017 dans l'Union Européenne. Le maïs MON 88017 présente les mêmes caractéristiques que le maïs hybride MON 863 x NK 603 qui a été évalué par l'AESA (*The EFSA Journal* 2005, 255, 1-21). Les maïs portant la modification génétique MON 863 sont autorisés en alimentation humaine (Décision de la Commission du 13 janvier 2006) et animale (Décision de la Commission du 8 août 2005). Les maïs portant la modification génétique NK 603 sont autorisés en alimentation humaine (Décision de la Commission du 3 mars 2005) et animale (Décision de la Commission du 19 juillet 2004).

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

- (1) Considérant que MON 88017 a été obtenu par transformation à l'aide d'une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* afin d'introduire les gènes *cry3Bb1* et *cp4 epsps* qui confèrent respectivement la résistance à certains insectes et la tolérance à un herbicide : le glyphosate ;

- (2) Considérant que le vecteur de transformation PV-ZMIR39 est un plasmide fonctionnant en système binaire¹ ;

Considérant que l'ADN-T porté par le vecteur de transformation PV-ZMIR39 contient les séquences (optimisées dans le contexte végétal) qui codent et régulent l'expression des gènes *cry3Bb1* et *cp4 epsps* :

- **Cassette *ctp2-cp4 epsps*** : le gène *cp4 epsps* (origine: *Agrobacterium sp.*) est précédé par la séquence *ctp2* (origine : *Arabidopsis thaliana*) qui code pour un peptide d'adressage dans les chloroplastes. La cassette *ctp2-cp4 epsps* est sous le contrôle d'une part de la région promotrice de la séquence de l'actine 1 du riz qui contient le promoteur (P-ract1) et le premier intron (ract1) et d'autre part de la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthétase, NOS 3' d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- **Cassette *cry3Bb1*** : le gène *MON 88017 cry3Bb1*, variant synthétique du gène *cry3Bb1* issu de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kumamotoensis*, 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 wt CAB du blé et de l'intron (ract1) et d'autre part de la séquence de terminaison tahsp17 3' issue du blé.

La protéine Cry3Bb1 (653 acides aminés) codée par le gène *MON 88017 cry3Bb1* diffère par 6 acides aminés par rapport à la protéine native Cry3Bb1 (652 acides aminés). Elle présente donc avec la protéine native plus de 95% d'homologie et 99,8% d'identité avec la protéine Cry3Bb1 présente dans MON 863 ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que des hybridations de type Southern ont été réalisées avec des sondes correspondant aux différentes parties du plasmide vecteur, sur de l'ADN de maïs témoin, de MON 88017 et du plasmide vecteur, hydrolysé par plusieurs endonucléases de restriction ; que l'analyse de ces hybridations montrent de façon convaincante que MON 88017 contient un seul fragment d'insertion et que ce fragment contient une seule copie issue du plasmide PV-ZMIR39, au niveau d'un seul locus dans le génome du maïs ;

Considérant que les analyses de ségrégation sont conformes aux lois de la génétique mendélienne confirment également que l'insertion chez MON 88017 s'est faite au niveau du noyau ;

Considérant que l'analyse moléculaire par Southern blot de MON 88017 a permis de vérifier l'intégrité du matériel génétique intégré et qu'aucune autre séquence pouvant correspondre à l'ADN du vecteur de transformation PV-ZMIR39 n'a été introduite dans le maïs MON 88017 ;

Considérant que la structure de l'insert a été vérifiée par PCR (polymerase-chain reaction) de façon complète avec de l'ADN de maïs témoin, de MON 88017 et du plasmide vecteur et que les éléments étaient organisés à l'intérieur de l'insert conformément à l'organisation décrite dans le plasmide PV-ZMIR39 ;

Considérant que :

- le séquençage d'un fragment d'ADN de 7126 pb appartenant au génome du maïs a été réalisée, comportant l'insert et les régions flanquantes en 5' (878 pb) et 3' (1000 pb) ;
- les séquences des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS déduites de cet ADN séquencé ont été comparées aux séquences protéiques déduites du vecteur de transformation PV-ZMIR39 et que cette comparaison des séquences en acides aminés montre que les séquences sont rigoureusement identiques ;

¹ 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.

Considérant que l'étude du site d'insertion aux extrémités 5' et 3' dans le maïs MON 88017 et le maïs conventionnel montre qu'au cours du processus d'intégration de l'ADN-T, se sont produites d'une part, une délétion de 25-27 pb et d'autre part, une insertion additionnelle de 20 pb dans le génome de MON 88017 ;

Considérant qu'afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence n'a été créée par l'insertion, une étude bioinformatique complète a été réalisée pour rechercher la présence d'ORF (open reading frame) putatives dans les 6 cadres de lecture au niveau des régions de bordures de l'insert ; que la comparaison des séquences déduites de ces ORF putatives, pouvant générer un peptide de plus de 8 acides aminés, avec des séquences figurant dans des banques d'allergènes, de toxines, de motifs peptidiques n'a pas mis en évidence d'homologie significative entre ces peptides putatifs et des séquences connues répertoriées dans ces banques de données ;

Considérant cependant qu'aucune information n'est fournie pour savoir si l'intégration de l'évènement MON 88017 s'est faite dans une région fonctionnelle ou non du génome du maïs, il conviendrait de réaliser une bioanalyse in silico des régions bordures de l'évènement et, éventuellement, des northern blot sur des extraits d'ARN totaux provenant de différents tissus de la plante (feuilles, tiges, racines et graines) pour répondre à cette interrogation ;

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

Considérant que les teneurs en protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS ont été mesurées par la méthode ELISA dans les feuilles et les racines de maïs MON 88017 et de maïs témoin, à différents stades de croissance, prélevées sur des plantes cultivées aux Etats-Unis sur 3 sites en 2002 ;

Considérant que les résultats montrent que ces teneurs diminuent au cours de la vie de la plante :

- dans les feuilles la teneur moyenne en Cry3Bb1 est comprise entre 570 et 350 µg/g de poids sec et celle en CP4 EPSPS est comprise entre 220 et 150 µg/g de poids sec (stade végétatif V3 à V17) ;
- dans les racines, la teneur moyenne en Cry3Bb1 est comprise entre 370 et 180 µg/g de poids sec (stade végétatif V3 à V17) et dans les racines sénescentes à 100 µg/g de poids sec et celle en CP4 EPSPS est comprise entre 150 et 70 µg/g de poids sec (stage V2 à plante sénescente) ;

Considérant que les teneurs en protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS ont été mesurées par la méthode ELISA dans divers tissus (pollen, stigmates, fourrage, chaume, grains, tiges et racines sénescentes) prélevés sur des plantes cultivées aux Etats-Unis en 2002 et en Argentine en 2003-2004 (grain uniquement) (tableau 1) ;

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéine Cry3Bb1 et CP4 PPS mesurées dans des plantes non traitées au glyphosate, exprimées en µg/g de poids sec de tissu

Tissu	Teneur en Cry3Bb1 (µg/g poids sec, écart-type, gamme)	Teneur en CP4 EPSPS (µg/g poids sec, écart-type, gamme)
Pollen (US)	25 (4,2) [17-32]	390 (85) [210-470]
Tige (US)	95 (19) [75-130]	57 (7,6) [42-69]
Racine (US)	130 (29) [98-170]	70 (20) [47-110]
Grain (US)	15 (3,6) [10-22]	5,8 (0,97) [4,1-7,1]
Grain (Argentine)	11 (3,3) [8-19]	4,6 (1,3) [3,5-7,5]

Considérant que la teneur en protéines Cry 3Bb1 et CP4 ESPSP diminue graduellement dans les tissus lors de la croissance de la plante surtout de la sénescence et que les teneurs les plus faibles sont observées dans le grain et sont du même ordre de grandeur dans les échantillons prélevés en 2002 aux Etats-Unis et en 2003-2004 en Argentine ;

(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 présent dans MON 88017 a été vérifiée par Southern et que la stabilité phénotypique a été vérifiée par dosage de la protéine Cry3Bb1 sur des plantes de plusieurs générations. Les données obtenues confirment que MON 88017 porte l'insert en un seul locus au niveau du génome nucléaire, qu'il est stable et qu'il suit 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) **Analyse comparative de la composition chimique**

Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons de plante entière et de grain d'un maïs hybride portant l'événement MON 88017 cultivé sur 3 sites aux Etats-Unis en 2002 (3 répétitions par site), traité au glyphosate et comparée à celle d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique que le maïs MON 88017 et d'échantillons provenant de 12 variétés commerciales de maïs hybride traité par des herbicides conventionnels et cultivés conjointement avec le maïs MON 88017 ;

Considérant qu'une seconde étude d'analyse de composition a été réalisée à partir d'échantillons de grain d'un maïs hybride portant l'événement MON 88017 cultivé sur 4 sites en Argentine en 2003-2004 conjointement avec un maïs témoin conventionnel et 16 variétés commerciales de maïs hybride.

Considérant que l'analyse de composition des grains a porté sur un ensemble de paramètres (constituants fourragers, 8 minéraux, 6 vitamines, 18 acides aminés, 9 acides gras, 5 facteurs antinutritionnels et métabolites secondaires potentiels (acide phytique, raffinose, furfural, acide férulique, acide para-coumarique) ;

Considérant que l'analyse statistique (analyse de variance) des différents paramètres montre qu'on observe des différences sporadiques statistiquement significatives ($p < 0,05$) sans signification biologique (16 aux Etats-Unis et 26 en Argentine). Les plus importantes concernent :

- des différences mineures sur la teneur en acides aminés, en fer et en magnésium entre le grain MON 88017 et le grain témoin cultivés en Argentine mais ces variations ne s'observent pas dans les grains cultivés aux Etats-Unis ;
- la vitamine B1 qui est globalement plus faible dans le grain MON 88017 cultivé aux Etats-Unis que dans le grain témoin mais cette différence ne s'observe pas dans les grains cultivés en Argentine ;
- la teneur en acide oléique qui est plus faible dans le grain MON 88017 cultivé en Argentine que dans le grain témoin mais cette différence ne s'observe pas dans les grains cultivés aux Etats-Unis ;
- la teneur en acide arachidonique qui est plus faible dans le grain MON 88017 cultivé aux Etats-Unis que dans le grain témoin mais cette différence ne s'observe pas dans les grains cultivés en Argentine ;
- la teneur en acide linoléique (62,85 % et 57,69 %) qui est plus élevée dans le grain MON 88017 que dans le grain témoin (61,52 % et 51,97 %) pour les grains cultivés respectivement aux Etats-Unis et en Argentine ;

Considérant cependant, qu'aucune différence significative n'est observée si la comparaison est faite avec les données mesurées dans les grains provenant des variétés

commerciales et que les teneurs mesurées restent dans les fourchettes des valeurs de la littérature (OCDE 2002²) ;

Considérant que l'ensemble de ces données conduit à conclure à une équivalence en substance entre le maïs grain portant l'évènement MON 88017 et son témoin, excepté la présence de faibles quantités de protéines recombinantes, et à l'absence d'effet du traitement par le glyphosate sur la composition chimique des grains et de la plante entière ;

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

Considérant que l'analyse des caractères agronomiques et phénotypiques (14 paramètres) de plantes MON 88017 cultivées sur 8 sites en 2001 et sur 10 sites en 2002, 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**

Considérant que plusieurs éléments permettent de considérer que les protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS n'auront pas d'effet toxique ou délétère :

- les protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS exprimées dans le maïs MON 88017 sont similaires à celles exprimées dans les variétés de maïs MON 863 et NK 603 précédemment autorisées (cf paragraphe A) ;
- l'historique de la commercialisation de maïs exprimant ces événements conduit à prendre en compte la production et la consommation de telles variétés aux USA depuis 2003 pour Cry3Bb1 (plus de 550 000 ha) et depuis 1996 à travers le monde pour CP4 EPSPS (plus de 100 millions d'ha) ;
- la comparaison des séquences de la protéine Cry3Bb1 exprimées dans le maïs MON 88017 avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques ne montre aucune homologie de séquence avec ces peptides ;
- la comparaison des séquences de la protéine CP4 EPSPS exprimée dans le maïs MON 88017 avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques montre une identité de séquence à 28,2 % avec la sphingomyérase de *Bacillus cereus* excluant un risque de toxicité ;

Considérant que l'équivalence fonctionnelle et biochimique des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS synthétisées par *E. coli* et extraites de MON 88017 a été démontrée ;

Considérant que :

- une étude de toxicité aiguë par voie orale de la protéine Cry3Bb1 exprimée dans MON 88017 a été réalisée chez la souris selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales et qu'à la dose maximale administrable (1930 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 CP4 EPSPS montre qu'à la dose de 572 mg/kg, on n'observe aucun effet délétère sur les animaux testés ;
- les marges de sécurité calculées à partir de ces doses uniques les plus élevées et en tenant compte de la teneur maximale en protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS dans le maïs, sont très protectrices (de l'ordre de 10⁻⁶) au regard de l'exposition alimentaire estimée des adultes et des adolescents. Il convient cependant de s'interroger sur la pertinence d'un tel calcul fondé sur une donnée de toxicologie aiguë ;

Considérant qu'*in vitro* la protéine Cry3Bb1 (synthétisée par *E. coli* ou extraite des grains de maïs MON 88017) est dégradée par les enzymes protéolytiques en milieu acide (fluide

² 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. Organization of European Cooperation and Development, Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, OECD ENV/JM/MONO (2002)25.

gastrique simulé) à 98-99,5% en 30 secondes et sa digestion dans un système intestinal simulé est effective à 99,5% en 1 minute laissant un polypeptide résiduel de 59 KDa qui conserve des propriétés insecticides testées sur des larves d'insectes ;

Considérant qu'*in vitro* la protéine CP4 EPSPS est rapidement dégradée en milieu gastrique simulé, soit 95 à 98 % dans les 15 secondes, et qu'en milieu intestinal simulé, plus de 50% sont digérés en 10 minutes, temps le plus court retenu pour cette analyse ;

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 (6 groupes de rats, 20 animaux de chaque sexe par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation d'un maïs grain MON 88017 non traité au glyphosate, 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 % dans la ration) ;

Considérant que la composition chimique du grain de maïs MON 88017 administré aux animaux a été déterminée et est conforme aux résultats de l'analyse de composition présentée ci-dessus (voir 7.1-3) ;

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres biochimiques, hématologiques et urinaires ont été mesurés au cours de l'étude et qu'au sacrifice des animaux à 90 jours, des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique des organes (+ poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur les organes ont été effectués ;

Considérant qu'on observe :

- une augmentation modeste de la consommation alimentaire des femelles nourries avec la ration à 33 % de maïs MON 88017 par rapport au groupe des femelles témoins, sans conséquence sur l'évolution pondérale ;
- une augmentation du nombre des neutrophiles uniquement chez les femelles nourries avec 33 % de maïs MON 88017 par rapport au groupe des femelles témoins mais que cette augmentation reste dans les limites historiques des variations observées chez cette souche de rat et qu'elle n'est pas associée à d'autres événements biologiques convergents ;

Considérant que la faible amplitude des variations observées chez un seul sexe, étayée par l'absence d'altération macroscopique ou microscopique des organes examinés, permet de conclure à une absence d'effets toxiques particuliers du maïs MON 88017 aux deux doses étudiées sans risque de déséquilibre alimentaire ;

(7.9) **Allergénicité**

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

- l'absence d'homologie de séquence des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ;
- l'absence de glycosylation de ces protéines ;
- la capacité de ces protéines à être dégradées ou digérées *in vitro* en milieu gastrique ou intestinal simulé ;
- la très faible teneur en protéines finales par rapport au poids frais des grains de maïs (0,012% pour CryBb1 et 0,0046 % pour CP4 EPSPS dans le grain de maïs) ;
- l'absence de cas rapportés d'allergénicité liés à la consommation de maïs NK603 et MON 863 utilisés depuis plusieurs années pour la consommation humaine dans les pays où la culture est déjà autorisée ;

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 des poulets (350 mâles et 350 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 88017 (54 et 59 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fonds génétique et 5 variétés commerciales de maïs cultivées aux Etats-Unis ;

Considérant que l'équivalence de composition chimique entre le maïs MON 88017 et les maïs témoins et les teneurs en mycotoxines des rations ont été vérifiées et que le dosage de la protéine Cry3Bb1 montre sa présence dans les rations à base de maïs MON 88017 et son absence (non détectée) dans les maïs témoins. Aucune information n'est cependant fournie sur la présence de la protéine CP4 EPSPS dans la ration alimentaire ;

Considérant que les observations ont porté sur 8 paramètres zootechniques, 7 données de découpe et 3x2 données de composition des muscles et que le taux de mortalité enregistré (0,9 %) 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 88017 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) et que le gras abdominal n'est pas modifié ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs grain MON 88017 avec son témoin non génétiquement modifié,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que, pour s'assurer que les produits dérivés des variétés de maïs portant l'évènement de transformation MON 88017 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les maïs conventionnels et leurs produits dérivés pour l'alimentation humaine et animale, il conviendrait de disposer :

- d'informations qui permettent de savoir si l'intégration de l'évènement MON 88017 s'est faite dans une région fonctionnelle ou non du génome du maïs ;
- des dosages de la protéine CP4 EPSPS dans la ration alimentaire.

Elle souligne le fait que la pertinence des études chez le rat et chez le poulet aurait été renforcée si ces études avaient été réalisées avec du maïs MON 88017 traité par du glyphosate.

Pascale BRIAND