

Maisons-Alfort, le 5 juin 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 LY038 dont la teneur en lysine a été modifiée
pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et
produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 21 mars 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 LY038 dont la teneur en lysine a été modifiée, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA/NL/2006/31).

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 24 mai 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 LY038 dans lequel le gène *cordapA* de la bactérie *Corynebacterium glutamicum* code la DiHydrate-DiPicolinate Synthétase (cDHDPs), enzyme impliquée dans la biosynthèse de la lysine. L'activité de cette enzyme a la particularité de ne pas être rétro-inhibée par la lysine, contrairement à celle du maïs. En conséquence, la teneur en lysine se trouve augmentée dans ce maïs.

La teneur en lysine est le facteur limitant primaire par rapport au besoin nutritionnel des animaux monogastriques en acides aminés. La supplémentation en lysine des aliments des porcs et des volailles, voire même des vaches laitières, est une pratique courante en production animale en Europe pour équilibrer son apport dans la ration alimentaire. Disponible sous forme de chlorhydrate ou de sulfate, la lysine apportée en supplémentation provient de la synthèse par fermentation microbienne par *Corynebacterium glutamicum* (synonyme de *Brevibacterium lactofermentum*), bactérie commune du sol la plus utilisée pour la production commerciale de lysine.

Les maïs génétiquement modifiés portant l'événement de transformation LY038 sont destinés à la consommation animale. Mais, afin de prendre en compte la présence fortuite éventuelle de ces maïs dans l'alimentation humaine, la demande porte également sur le grain et ses produits dérivés pour la consommation humaine. Elle ne concerne pas la mise en culture de LY038 dans l'Union européenne.

(B) Informations relatives aux plantes parentales

Considérant que le maïs LY038 provient du croisement conventionnel entre un maïs portant les gènes *cordapA* et *nptII* et un maïs portant les gènes *nptII* et *cre* ;

Parent de LY038 portant les gènes *nptII* et *cordapA*

Un 1^{er} maïs a été obtenu par transformation par biolistique de cals issus de la lignée H99 de maïs avec de l'ADN purifié constitué d'un fragment XhoI de 5,9 kb, isolé à partir du plasmide PV-ZMPQ76 de 8,8 kb. Le fragment XhoI est constitué des séquences fonctionnelles suivantes (en dehors des très courtes séquences synthétiques ayant permis la liaison des différents éléments lors de sa construction) :

- le promoteur du gène *Glb1* codant une globuline spécifique de l'embryon chez le maïs ;
- l'intron du gène d'actine *rAct1* du riz ;
- la séquence mDHDPS CTP codant le peptide d'adressage au chloroplaste de la dihydrodipicolinate synthétase (DHDPS) de maïs ;
- la séquence *cordapA* codant la cDHDPS de *Corynebacterium glutamicum*, enzyme insensible à la rétro-inhibition par la lysine ;
- la région 3' transcrite non traduite assurant la fin de transcription du gène de globuline *Glb1* du maïs (*Glb1* 3' UTR) ;
- un site *lox* issu du bactériophage P1 cible de sa recombinaise CRE ;
- le promoteur initiant la transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (p CaMV 35S), à expression quasi constitutive dans les cellules végétales ;
- la séquence *nptII* codant la néomycine phosphotransférase, issue du transposon Tn5 isolé du colibacille ;
- la séquence suivant le gène *nptII* sur le transposon Tn5, composée d'une partie (153 pb¹ sur 378) du gène *ble* codant la bléomycine phosphotransférase ;
- le site de terminaison de transcription du gène *nos* codant la nopaline synthétase dans le T-DNA issu d'une souche à nopaline d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- un site *lox* issu du bactériophage P1 cible de sa recombinaise CRE.

Parent de LY038 portant les gènes *nptII* et *cre*

Le 2^{ème} maïs a été obtenu par transformation par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide PV-ZM003. L'ADN-T est constitué comme suit :

- le promoteur du gène actine 1 du riz ;
- le premier intron du même gène actine 1 du riz ;
- la séquence du gène *rec3* du coliphage P1 codant la recombinaise site-spécifique CRE ;
- la séquence comportant les signaux de terminaison de transcription et de polyadénylation, issue du gène de la nopaline synthétase du T-DNA d'un pTi d'*A. tumefaciens* ;
- le promoteur de transcription de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ainsi que sa région "enhancer" doublée ;
- l'intron du gène *hsp70* de maïs (stabilisant le niveau de transcription) ;
- la séquence *nptII* codant la néomycine phospho-transférase issue du transposon Tn5 isolé du colibacille ;
- la séquence suivant le gène *nptII* sur le transposon Tn5, composée d'une partie (153 pb sur 378) du gène *ble* codant la bléomycine-phosphotransférase ;
- la séquence comportant les signaux de terminaison de transcription et de polyadénylation, issue du gène de la nopaline-synthétase du T-DNA d'un pTi d'*A. tumefaciens*.

(C.) Informations relatives à la modification génétique

- (1) Considérant que le gène *nptII* de sélection présent dans le parent (1^{er} maïs) était encadré par deux sites *lox* et que lors du croisement avec la lignée de maïs portant le gène *cre* (2^{ème} maïs) codant la recombinaise spécifique des sites *lox*, ce gène *nptII* a été éliminé. Le site *lox* (34 pb) reconnu par la seule recombinaise CRE du bactériophage P1 est constitué d'une séquence de 8 pb flanquée de deux copies inversées d'une même séquence de 13 pb, sites d'accrochage de la recombinaise CRE. L'excision, catalysée par

¹ pb : paire de bases

la recombinaison CRE, de l'ADN compris entre deux exemplaires de la séquence *lox* laisse sur l'ADN cible une copie recombinée de la séquence *lox* ;

- (3) Considérant que *Corynebacterium glutamicum*, microorganisme source de la séquence codant la protéine cDHDPS, est une bactérie commune dans le sol et l'environnement végétal. Cette bactérie est utilisée depuis plusieurs décennies pour la production industrielle de L-lysine par fermentation, autorisée en alimentation tant animale qu'humaine. *C. glutamicum* a été préféré à d'autres bactéries à cause de ses mécanismes de régulation simplifiés voire même parfois inexistantes comme au niveau de la DHDP, insensible ou très faiblement sensible à la rétro-inhibition de son activité par la lysine ;

Considérant que l'insertion finale attendue dans le génome de LY038 est une séquence au maximum de 4222 pb comportant :

- une cinquantaine de pb d'une séquence de liaison synthétique entre le site Xho1 et le promoteur ;
- 1391 pb du promoteur du gène *Glb1* codant une globuline qui, chez le grain de maïs, est la plus abondante des protéines spécifiques de l'embryon ;
- 6 pb d'une séquence de liaison synthétique ;
- 480 pb de l'intron du gène d'actine *rAct1* du riz ;
- 1 pb d'une séquence de liaison synthétique ;
- 170 pb de la séquence mDHDPS CTP codant le peptide d'adressage au chloroplaste de la dihydropicolinate synthétase (DHDP) de maïs ;
- 902 pb de la séquence *cordapA* codant la cDHDPS de *Corynebacterium glutamicum*, enzyme insensible à la rétro-inhibition par la lysine ;
- 75 pb d'une séquence de liaison synthétique ;
- 999 pb de la région 3' transcrite non traduite assurant la fin de transcription du gène de globuline *Glb1* chez le maïs (*Glb1* 3' UTR) ;
- 10 pb d'une séquence de liaison synthétique
- 34 pb du site *lox* demeuré après excision du gène *nptII* par la recombinaison fournie en trans par l'autre ADN transféré provenant du pollen du second parent ;
- une centaine de pb du vecteur incluant une séquence de liaison synthétique ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que des hybridations moléculaires de type Southern (réalisées avec différentes sondes radiomarquées correspondant aux produits d'amplification par PCR de chaque portion des vecteurs plasmidiques) ont permis de vérifier que :
- les maïs portant l'événement de transformation LY038 contiennent une seule copie du gène *cordapA* ;
 - le fragment inséré est complet et intact dans le génome du maïs ;
 - aucune autre séquence originaire des vecteurs ou des autres transgènes présents chez les parents n'est encore présente dans les maïs LY038 (absence des gènes *cre* et *nptII* du parent donneur de pollen, éliminés par ségrégation au cours des générations et absence du gène *nptII* initialement cotransféré avec le gène *cordapA*, mais qui a bien été excisé par action de la recombinaison CRE sur les sites *lox* qui le bordaient) ;
 - aucun fragment d'ADN du vecteur plasmidique ne s'est intégré au génome du maïs ;

Considérant que la preuve de la perte des deux gènes *nptII* et du gène *cre* est apportée par des hybridations négatives avec les sondes appropriées, tandis que les contrôles positifs témoignent de la validité des sondes et de leur capacité d'hybridation ;

Considérant que les analyses par restriction et hybridation de type Southern montrent que le gène *cordapA* codant la protéine cDHDPS est inséré de façon covalente au sein du génome nucléaire et qu'il se transmet comme un caractère mendélien ;

Considérant cependant que la localisation chromosomique exacte du transgène sur la carte génétique du maïs n'est pas précisée dans le dossier ;

Considérant que le transgène et ses régions flanquantes (1781 pb en amont et 667 pb en aval) ont été séquencés et que l'analyse de ces séquences révèle une insertion de 4176 pb, comprenant l'intégralité du gène codant la DHDPS et 34 pb du site *lox* après excision du gène *nptII* de sélection et que, par rapport au fragment Xho1 transféré, l'ADN inséré aurait perdu 4 pb appartenant à la séquence de liaison avant le début du promoteur et 42 pb après la fin du gène et du site *lox* ;

Considérant que les phases ouvertes de lecture (ORF) dans les 6 cadres de lecture possibles ont été recherchées aux jonctions avec l'ADN introduit et que l'analyse ces de ces séquences conduit à identifier :

- côté 5', 6 polypeptides putatifs ;
- côté 3', 5 polypeptides putatifs ;

Considérant 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 et de toxines, n'a pas mis en évidence d'homologie significative entre ces peptides putatifs et des séquences connues répertoriées dans ces banques de données ;

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

Considérant que la voie de biosynthèse de la lysine est assez comparable chez la plupart des bactéries et des plantes dont *Zea mays*. La DHDPS (EC 4.2.1.52) est la première enzyme de la chaîne spécifique de biosynthèse de la lysine (qui débute avec le 3-semialdéhyde aspartate) et se trouve donc classiquement être une enzyme limitante car soumise à un ou plusieurs mécanismes de régulation liés à la concentration intracellulaire en lysine (Ki d'environ 5 à 50 µM chez les plantes). Cette enzyme est commune et ubiquitaire chez les plantes et les micro-organismes (bactéries, moisissures...) ;

Considérant que la caractéristique des plantes LY038 est de synthétiser davantage de lysine que les maïs conventionnels, car elles produisent, en plus de l'enzyme d'origine présente naturellement dans le maïs, une autre DHDPS apportée par expression du transgène, celle de *Corynebacterium glutamicum*, qui a la particularité d'être une enzyme insensible à l'inhibition en retour par la lysine. Il en résulte que la première étape de biosynthèse de la lysine n'étant plus limitante, la synthèse de cet acide aminé est augmentée dans l'embryon des grains compte tenu du promoteur *Glb1* choisi ;

Considérant que d'autres composés de la même chaîne de biosynthèse sont attendus en plus grande abondance, en particulier l'acide α-aminoadipique et la saccharopine (tableau 3) ;

Considérant que la protéine cDHDPS a été clonée dans *E. coli* et que l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS PAGE), en test immunologique ("western") et en spectrométrie de masse MALDI-TOF montre que la protéine clonée dans *E. coli* et celle exprimée dans le maïs ont le même poids moléculaire apparent ;

Considérant que la séquence N-terminale de la protéine exprimée dans le maïs conserve 3 acides aminés supplémentaires (ala - ile - thr) apportés avec le peptide d'adressage du maïs dont la séquence codante lui a été adjointe dans la construction du transgène ;

Considérant que ces deux protéines ont des activités biologiques identiques (test immunologique) et que la protéine produite par la plante n'est pas glycosylée ;

Considérant que les quantités de protéine cDHDPS ont été analysées par la technique ELISA dans divers tissus de maïs LY038 prélevés sur des plantes cultivées en 2002 sur 5 sites d'essais aux USA et 4 sites en Argentine et que les résultats montrent que les quantités de protéine cDHDPS sont similaires aux USA et en Argentine (tableau 1) :

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéine cDHDPS mesurées dans divers tissus de plantes prélevés aux USA et en Argentine, exprimées en µg/g de poids frais de tissu

Tissu	USA (µg/g poids frais, écart-type, gamme)	Argentine (µg/g poids frais, écart-type, gamme)
Plante entière	0,0093 (0,0083 [0,0026-0,026])	-
Pollen	0,43 (0,14) 0,27-0,67	0,59 (0,16) [0,35-0,87]
Fourrage	0,25 (0,21) [0,034-0,79]	0,042 (0,014) [0,027-0,08]
Racine	0,14 (0,23) [0,011-0,62]	-
Grain	24 (9,1) [13-43]	23 (7,2) [28-53]
Jeune feuille (OSL 1-4)	>LOD (0,013)	n/a

Considérant que, comme attendu, l'expression s'avère préférentielle dans le grain (de l'ordre de 10 fois plus élevée que dans les autres tissus), compte tenu de la présence du promoteur *Glb1* spécifique de l'embryon ;

Considérant que la protéine native du maïs mDHDPS a été détectée chez la plante témoin parentale ayant le même fonds génétique sans pouvoir y être quantifiée ;

(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 sur plusieurs générations, tant au cours des croisements entre parents apportant les gènes d'une part *nptII* et *cre*, d'autre part *nptII* et *cordapA*, puis au cours des autofécondations ou croisements successifs impliquant des maïs LY038 (gène *cordapA*) et que l'accumulation de lysine dans le grain y est retrouvée ;

(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 de plantes entières et de grains d'un maïs hybride portant l'événement LY038 cultivé :

- sur 5 sites aux Etats-Unis en 2002 (4 répétitions par site) et comparée à celle d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique que le maïs LY038 et d'échantillons provenant de 4 variétés commerciales ;
- sur 4 sites en Argentine en 2001/2002 (4 répétitions par site) et comparée à celle d'échantillons d'un maïs témoin ayant le même fonds génétique que le maïs LY038 et d'échantillons provenant de 15 variétés commerciales ;

Considérant que l'analyse de composition des échantillons de plante entière a porté sur un ensemble de 10 paramètres (protéines brutes, matière grasse, cendres, humidité, ADF, NDF, Lysine, Ca, P et hydrates de carbone) et pour les grains sur les mêmes paramètres ainsi que sur le taux de fibres totales, les acides aminés, la lysine libre, les acides gras (C8-C22), 9 minéraux (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn) ; 6 vitamines (B1 ; B2 ; B6 ; E ; Niacine, Acide folique), 2 facteurs antinutritionnels et 3 métabolites secondaires propres au maïs et 6 métabolites liés à la biosynthèse et au catabolisme de la lysine (l'homosérine, la cadavérine, l'acide 2,6-diaminopimélique, la saccharopine, l'acide α -aminoadipique et l'acide pipécolique) (75 paramètres au total) ;

Considérant que l'analyse statistique (analyse de variance) des différents paramètres montre que :

- sur les échantillons prélevés aux USA (396 comparaisons), sur 22 valeurs qui présentent une différence statistique significative par rapport au témoin, 14 valeurs sont liées à la modification génétique (teneur en lysine et en ses métabolites). Les 8 autres différences observées sur 1 ou 2 sites au maximum par rapport au témoin, dont le taux de fibres totales, sont dans la gamme des valeurs de la littérature et sont sans signification biologique ;
- sur les échantillons prélevés en Argentine (335 comparaisons), sur 18 valeurs qui présentent une différence statistique significative par rapport au témoin, 15 valeurs sont liées à la modification génétique (teneur en lysine et en ses métabolites). Les 3 autres différences observées sur 1 ou 2 sites au maximum par rapport au témoin concernent la teneur en eau et la teneur en proline. Elles sont dans la gamme des valeurs de la littérature et sont sans signification biologique ;
- les teneurs en lysine (libre et totale) est la seule modification significative du compartiment des acides aminés dont le taux est très légèrement amélioré dans le maïs grain LY038 en raison d'une augmentation du taux de protéines (tableau 6) ;
- les teneurs en acides gras, notamment ceux en C18 (tableau 2) ne sont pas modifiées par l'introduction de la modification génétique ;

Tableau 2 : Teneur en acides gras (exprimée en % du poids du grain frais)

	Maïs grain témoin	Maïs grain LY038
C18 :1	1,06	1,08
C18 :2	2,30	2,21
C18 :3	0,0479	0,0470

Considérant plus particulièrement les teneurs comparées en lysine et en ses métabolites, les résultats (tableau 3) sont les suivants :

Tableau 3 : Taux comparés de lysine et de ses métabolites dans le grain (exprimé en µg/g de matière sèche)

	Maïs grain LY038	Maïs grain Témoin
Protéines (% MS)	12,90	12,12
Lysine libre	1351	26
Saccharopine	650	5,9
Acide α-aminoadipique	56,6	6,3
Acide L pipécolique	28,7	14,96
Cadavérine	< LOD	< LOD
Acide 2,6-diaminopimélique	< LOD	< LOD

Considérant que les teneurs respectives en lysine libre et en saccharopine du grain (exprimées par rapport à la somme des acides aminés totaux) traduisent l'enrichissement en lysine des maïs LY038 dans tous les essais (échantillons prélevés aux USA et en Argentine) et sont caractérisées par une très faible variabilité (tableau 4) ;

Tableau 4 : Teneur en lysine et saccharopine du grain de maïs : effet de la modification génétique et fourchette des valeurs

	Argentine		USA	
	Grain de maïs LY038	Grain de maïs Témoin	Grain de maïs LY038	Grain de maïs Témoin
Lysine, (% acide aminés totaux)	3,5-3,7	2,4-2,7	3,5-4,3	2,5-3,0
Lysine libre (µg/g MS)	1255-1614	17,4-44,5	994-1580	19,4-38,5
Saccharopine (µg/g MS)	707-818	2,3-8,2	583-773	2,8-7,4

Considérant que la synthèse de la lysine et son catabolisme chez les plantes ont été analysés et qu'une étude publiée en 2006² attire l'attention sur les points suivants :

- un équilibre étroit existe chez les plantes entre biosynthèse et catabolisme de la lysine *via* des mécanismes complexes de régulation encore mal connus et faisant intervenir plusieurs niveaux de régulation ;
- plus la concentration en lysine est élevée, en particulier dans l'embryon, plus le catabolisme³ est activé par l'enzyme LKR (lysine ketoglutarate reductase) couplée à la SDH (saccharopine dehydrogenase), les deux produits de ce complexe enzymatique étant la saccharopine et l' α -aminoadipate semialdehyde qui est transformé en acide α -aminoadipique par une autre enzyme, l'ASD (aminoadipic semialdehyde dehydrogenase) ;
- le catabolisme se poursuit jusqu'à la production d'acétyl-coenzymeA et de glutamate, les intermédiaires du catabolisme (saccharopine et acide α -aminoadipique) ne devant donc pas s'accumuler outre mesure même si leur concentration est supérieure chez les plantes modifiées productrices de lysine (tableau 4) ;
- la cadavérine n'est plus considérée comme un produit du catabolisme de la lysine chez les plantes, ce qui semble confirmé par les analyses effectuées (tableau 3) ;

Considérant que l'ensemble des données analytiques présentées permet de conclure que le maïs LY038 n'est pas équivalent en substance à son témoin ayant le même fonds génétique en raison de sa modification génétique qui vise à un enrichissement spécifique en lysine (+ 46 %), constituant un avantage nutritionnel substantiel pour l'alimentation animale, prévenant les carences (en lysine) et évitant au moins partiellement une supplémentation excessive (en lysine de synthèse) des aliments composés pour animaux ;

Considérant que pour tous les autres paramètres analysés, le maïs LY038 ne présente pas de différence de composition avec le maïs témoin ;

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

Considérant que le taux de germination est similaire pour les maïs portant l'événement LY038 et pour le témoin (respectivement 98,8 % et 98,5 %) et que la présence de lysine libre et de ses métabolites ne perturbent pas la viabilité de l'embryon ;

² Stepansky, A., Less, H., Angelovici, R., Aharon, R., Zhu, X. and Galili, G. (2006). Lysine catabolism: an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino Acids* 30: 121-125.

³ Ce catabolisme activé se traduit par une augmentation de la concentration des grains en ces deux composés (saccharopine et acide α -aminoadipique) chez plusieurs types de mutants d'*Arabidopsis* produisant plus de lysine que la plante sauvage, ainsi que chez le riz et le soja. La régulation du complexe LKR/SDH fait l'objet de recherches par plusieurs équipes.

(7.8) **Toxicologie****Exposition potentielle de l'homme à des maïs enrichis en lysine**

Considérant que :

- selon diverses estimations, les besoins en lysine seraient de :
 - 12 mg/kg p.c./j (soit 840 mg/j pour un adulte de 70 kg) (FAO, 1985)⁴ ;
 - 30 mg/kg p.c./j (soit 2100 mg/j pour un adulte de 70 kg) (ANC, 2001)⁵ ;
 - 31 mg/j (soit 2170 mg/j pour un adulte de 70 kg) ("Dietary Reference intakes" FNB/IOM, 2002)⁶ ;
- la consommation de lysine est de 5,3 g /j pour un adulte (incluant les compléments alimentaires) en Amérique du Nord (FNB/IOM, 2005)⁷ et de 6,1 g/j en France de (Martin *et al*, 2004)⁸ et qu'aucune limite de sécurité n'a été fixée pour la lysine, l'apport supplémentaire éventuel en lysine par le maïs LY038⁹ qui représenterait 1,1 mg/j pour un adulte de 70 kg, soit 700 à 1900 fois moins que l'apport nutritionnel recommandé selon les estimations, ne présenterait pas un risque pour le consommateur¹⁰ ;

Considérant que deux métabolites majeurs de la lysine, l'acide α -aminoadipique et la saccharopine, sont présents dans des végétaux consommés par l'homme à des teneurs voisines de celles mesurées dans le grain des maïs LY038 (tableau 5) ;

Tableau 5 : Teneur comparée en acide α -aminoadipique et en saccharopine ($\mu\text{g/g}$ de matière sèche) dans des végétaux consommés par l'homme et dans le maïs grain LY038

Aliment	Maïs LY038	Maïs témoin	Broccoli	Champignons
Saccharopine	650	6	122	629
Acide α -aminoadipique	57	6	490	637

Considérant que l'exposition alimentaire moyenne de l'homme à l'acide α -aminoadipique est 0,34 $\mu\text{g/kg}$ de poids corporel/jour sans conséquences néfastes sur sa santé ;

Toxicité aiguë

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë a été réalisée chez la souris par administration orale de 800 mg/kg p.c.¹¹ de la protéine cDHDPS produite par *E. coli* ; après 14 jours, on n'observe aucun effet négatif sur la croissance des animaux (poids et consommation alimentaire) et l'examen macroscopique des organes ne met pas en évidence de différences entre les souris traitées et les souris témoins (dose sans effet observé supérieure à 800 mg/kg p.c.) ;

⁴ FAO/OMS (1985). Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU expert consultation, Technical report series 724.

⁵ Martin A., Azais-Braesco V., Bresson J.-L., Couet C., *et al*. Eds. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris, Tec&Doc.

⁶ FNB/IOM (2002). Protein and amino acids. In: FNB/IOM Eds. Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (macronutrients). Washington D.C., The National Academies Press, pp. 1-143.

⁷ FNB/IOM (2005). Protein and Amino acids. In: Eds. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington, D.C., The National Academies Press, pp. 589-768.

⁸ Martin A., Touvier M. and Volatier J. L. (2004). The basis for setting the upper range of adequate intake for regulation of macronutrient intakes, especially amino acids. *J Nutr*, 134, pp. 1625S-1629S; discussion 1630S-1632S, 1667S-1672S.

⁹ Compte tenu des quantités de maïs importées dans l'UE, de la part que représenterait le maïs LY038 dans ces importations, 0,2 % de maïs LY038, correspondant à une consommation de 3 mg/j (fort consommateur au 97,5^{ème} percentile), contenant au maximum 5300 $\mu\text{g/g}$ de lysine pourrait être consommé par l'homme.

¹⁰ Des déficits enzymatiques rares peuvent entraîner une intolérance à la lysine (déficits en lysine-cétoglutarate réductase, en transporteur des acides aminés basiques ou en aminoadipique-semialdéhyde glutamate réductase (avis de l'Afssa du 18 décembre 2006)

¹¹ p.c. : poids corporel

Considérant que plusieurs éléments permettent de considérer que la protéine cDHDPS n'aura pas d'effet toxique ou délétère :

- l'organisme donneur *C. glutamicum* est une bactérie commune de l'environnement qui n'est pas connue pour être pathogène chez l'homme ou l'animal ;
- l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine cDHDPS synthétisée par *E. coli* et celle extraite de LY038 a été démontrée ;
- la comparaison des séquences de la protéine issue de *C. glutamicum* avec celles d'*E. coli*, du maïs, du riz, du blé et du soja montre une identité comprise entre 27 et 37 % et une similarité comprise entre 36 et 47 % ;
- la comparaison des séquences de la protéine cDHDPS exprimée dans le maïs LY038 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 ;

Considérant que :

- selon le régime anglais, la consommation moyenne de maïs pour un adulte (70 kg) est de 15,5 g/j et pour un enfant (14,5 kg) de 6,2 g/j,
 - dans le pire des cas, 0,2 % de maïs LY038 contenant 26 µg/g de protéine cDHDPS entrerait dans la consommation,
 - la dose sans effet observé est de 800 mg/kg p.c. chez la souris,
- la marge de sécurité serait de 7.10^7 pour un adulte et de 7.10^6 pour un enfant. Si l'on considère la dose sans effet observé déduite de l'étude 90 jours chez le rat de 25000 mg/kg p.c./j cette marge de sécurité est de 6.10^4 pour un adulte et de 3.10^4 pour un enfant ;

Toxicité subchronique

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 (3 groupes de rats, 20 animaux de chaque sexe par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation de maïs grain LY038 incorporé à hauteur de 11 % (supplémenté avec 22 % de maïs témoin) 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 LY038 et du maïs témoin administrés aux animaux a été déterminée (tableau 6) ainsi que la présence éventuelle de 4 pesticides, 19 mycotoxines (dont la fumonisine B1), 4 métaux lourds ;

Tableau 6 : Composition du grain de maïs en principaux acides aminés (µg/g)

Evènement	Maïs grain témoin	Maïs grain LY038
Humidité, %	12,7	12,8
Protéines %	8,89	9,52
Lysine %	2,55	3,70 (+45%)
Lysine libre	48,7	958
Saccharopine	8,7	244
Méthionine	1,69	1,95
Cystine	1,78	1,93
Histidine	2,84	3,08
Isoleucine	3,02	3,24
Phénylalanine	4,15	4,46
Thréonine	2,91	3,05
PCR cDHDPS	-	+
Fumonisine B1	0,5	0,7

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingérée 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 que l'on n'observe aucun effet négatif sur la croissance (poids corporel des mâles ou des femelles) et sur la quantité d'aliment ingérée, ce qui pourrait faussement montrer provisoirement une équivalence alimentaire des deux maïs grain LY038 et témoin ;

Considérant que l'analyse des données de l'étude de toxicité à 90 jours montre :

- des modifications limitées à un seul sexe pour les quelques paramètres cliniques ou biochimiques concernés (volume urinaire chez les mâles, urée chez les femelles), les valeurs observées restant toutefois dans la fourchette des données historiques de l'espèce pour le centre investigateur et n'ayant aucune traduction histologique évoquant une perte de fonctionnalité d'un organe cible ;
- une baisse des érythrocytes et de l'hémoglobine significative à 33 % de LY038 exclusivement chez les femelles demeurant toutefois dans la fourchette des données historiques de l'espèce pour le centre investigateur ;

Considérant que les observations macroscopiques des organes ne font pas apparaître d'effet des traitements ;

Considérant que les altérations microscopiques concernent aussi bien les animaux témoins que les traités et qu'elles sont, en conséquence, sans pertinence toxicologique ;

Considérant que les faibles amplitudes des variations, observées chez un seul sexe pour chaque paramètre concerné, lesquelles demeurent dans la fourchette des valeurs historiques de la souche de rat pour le centre investigateur, permettent de conclure à une absence d'effets toxiques particuliers liés à l'ingestion répétée de maïs grain LY038 aux deux doses étudiées correspondant à l'ingestion maximale de 0,4 mg de protéine DHDPs par kg de poids corporel ;

(7.9) **Allergénicité**

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

- la comparaison de la structure de la protéine cDHDPs exprimée dans le maïs LY038 avec les protéines répertoriées dans les bases de données d'allergènes connus ne met pas en évidence de structure commune avec des peptides pouvant présenter un potentiel allergénique ;
- la protéine cDHDPs produite par *E. coli* est dégradée *in vitro* en milieu gastrique simulé à 96 % en 30 secondes ;
- la protéine cDHDPs n'est pas glycosylée dans le maïs LY038 ;
- la protéine cDHDPs présente une grande similitude avec la protéine produite par fermentation du *C. glutamicum* ;

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 le poulet (1300 animaux) nourri 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 grain LY038 (> 60 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du

mais témoin ayant le même fonds génétique supplémenté¹² ou non en lysine et avec 5 variétés commerciales supplémentées ou non en lysine ;

Considérant que les observations ont porté sur des paramètres zootechniques et de rendement sur carcasse et que le taux de mortalité enregistré (1,2 %) au cours de l'expérimentation est non lié au traitement ;

Considérant que les performances de croissance et de consommation, l'indice de consommation et les critères de carcasse et de découpe répondent remarquablement au taux de lysine des rations (P<0,001) (tableau 7) et que les résultats présentés permettent également d'exclure tout effet néfaste non intentionnel lié à la modification génétique ainsi que tout effet autre (mycotoxines, pesticides..) ;

Tableau 7 : Protocole expérimental et résultats
(poids des animaux, efficacité, poids du muscle pectoral frais)

Base grain	Lysine totale % (2)	Lysine sup.	Poids à 42 j (kg)	Efficacité alimentaire	Muscle pectoral (g)
LY038	1,05 -0,90	0	2,17	0,56	350
témoin	0,97-0,82 (3)	0	1,61**	0,50**	220**
témoin	1,05 -0,90	+	2,19	0,56	350
ASG (1)	0,97 -0,82	0	1,65**	0,49**	230**
ASG	1,05 – 0,90	+	2,13	0,55	340
DKC (1)	0,97 -0,82	0	1,57**	0,49**	210**
DKC	1,05 -0,90	+	2,08	0,56	330

(1) Variété commerciale ; (2) Ration démarrage et/ finition ; (3) Ration ne couvrant pas le besoin en lysine seule (facteur limitant primaire) ; ** différences significatives à P<0,01 avec le régime LY038

Considérant l'ensemble des résultats présentés, il est possible de conclure que le maïs LY038 qui contient plus de lysine (libre) par rapport à son poids frais, a une valeur alimentaire augmentée par rapport à son témoin et aux cinq variétés commerciales testées et que la lysine supplémentaire générée par la modification génétique est aussi biodisponible que la lysine de synthèse (issue de la fermentation microbienne) ;

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime qu'en se fondant sur les résultats présentés dans ce dossier, notamment la construction génétique, le métabolisme de la lysine dans le maïs grain LY038, les études de toxicologie aiguë, sub-chronique et d'alimentarité (poulets nourris avec du maïs grain), la consommation de maïs portant l'événement de transformation LY038 par les animaux présente le même niveau de sécurité sanitaire que la consommation de maïs non génétiquement modifié.

Bien qu'il soit précisé que le maïs LY038 sera destiné à l'alimentation animale, il n'est pas exclu que ce maïs puisse se retrouver dans l'alimentation humaine. Compte tenu des données fournies et des besoins en lysine chez l'homme comparés au niveau d'expression dans le maïs LY038, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que la consommation de maïs LY038 par l'homme présente le même niveau de sécurité sanitaire que la consommation de maïs non génétiquement modifié.

Pascale BRIAND

¹² L'étude a été effectuée en substituant au maïs expérimental LY038 dans la ration formulée avec un taux de lysine suboptimum (en dessous) du besoin pour les performances maximum. Toutes les rations ont été équilibrées à 105 % des besoins pour Met, Cyst, Arg, Thr et Try de façon à ce que seule la lysine soit le facteur limitant primaire, en évacuant l'hypothèse d'un facteur limitant secondaire. Les rations avaient une teneur maximum en maïs (> 60%), à base de maïs témoin à 0,26% de lysine par rapport au poids frais et /ou à base de LY038 à 0,37% de lysine.