

COMMISSION DU Génie BIOMOLECULAIRE

Paris, le 2 octobre 2003

AVIS

La Commission du génie biomoléculaire a été saisie, le 4 septembre 2003, par les autorités compétentes françaises (Direction générale de l'alimentation) d'une demande d'avis relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié, tolérant à l'herbicide glufosinate d'ammonium et résistant à certains ravageurs du maïs (sésamie et pyrale), en vue de l'importation dans l'Union Européenne.

La Commission du génie biomoléculaire réunie en séance plénière le 30 septembre 2003, sous la présidence du Professeur Marc FELLOUS, a procédé à l'examen du dossier déposé par PIONEER Hi-Bred International et Mycogen Seeds, relatif à "la DEMANDE DE MISE SUR LE MARCHE du maïs génétiquement modifié TC 1507, au titre de l'article 15 de la directive 2001/18/CE (partie C)".

Ce dossier correspond à la demande d'autorisation de mise sur le marché de maïs génétiquement modifié des sociétés PIONEER Hi-Bred International et Mycogen Seeds, conformément aux informations requises par les annexes II, III, IV et VII de la directive 2001/18/CE et appendices contenant les détails des études sur l'OGM relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé publique et l'environnement. Ce dossier a été déposé pour l'évaluation initiale auprès des autorités compétentes néerlandaises sous la référence C/NL/00/10.

La Commission du génie biomoléculaire a considéré les caractéristiques des séquences introduites et a procédé à l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement.

1. Introduction

Le dossier scientifique de demande d'autorisation de mise sur le marché de maïs génétiquement modifié des sociétés PIONEER Hi-Bred International et Mycogen Seeds contient les informations requises par les annexes de la directive 2001/18/CE relatives à l'évaluation de la sécurité sur la santé publique et l'environnement que présente l'OGM. Un rapport d'évaluation des autorités néerlandaises a été transmis avec le dossier scientifique.

2. Utilisation

La demande d'autorisation porte sur l'importation et l'utilisation des grains de la lignée génétiquement modifiée TC 1507 et des variétés qui en dérivent, en vue de leur transformation et de leur consommation. La demande d'autorisation ne concerne pas la culture sur le territoire européen des semences issues de cet événement de transformation.

3. Description du produit

3.1. Méthode de transformation

L'événement TC 1507 correspond à un maïs génétiquement modifié tolérant à l'herbicide glufosinate d'ammonium et résistant à certains lépidoptères, tels que la pyrale du maïs (*Ostrina nubilalis*).

Cet événement de transformation a été obtenu par bombardement de cellules embryogènes en culture *in vitro* avec un fragment linéaire d'ADN de 6235 bp, dérivé du plasmide PHP89999 et isolé à partir d'un gel d'électrophorèse en agarose. Les plantes sont régénérées à partir des cultures de cellules transformées.

3.2. Description moléculaire et génétique

a) le plasmide

Le plasmide PHP89999 contient :

- Une cassette d'expression qui comprend une version tronquée du gène codant pour la protéine CRY1F, isolé de *Bacillus thuringiensis* ssp *aizawai*, et placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine ZM1(2) de maïs et du terminateur de la mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le premier intron de ZM1(2) est conservé.

La séquence *cry1F* a été tronquée en 3' de telle sorte que la protéine synthétisée ne représente que les 605 premiers acides aminés de la protéine CRY1F de *Bacillus thuringiensis* ssp *aizawai*. La séquence d'ADN a été modifiée pour optimiser l'usage des codons ; un seul acide aminé a été modifié par rapport à la séquence initiale : une leucine remplace une phénylalanine en position 604.

- Une cassette d'expression qui comprend la séquence du gène *pat*, isolé de la souche Tü494 du micro-organisme du sol *Streptomyces viridochromogenes*, codant pour la phosphinotricine acétyl transférase, et placé sous le contrôle du promoteur et du terminateur du gène 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

- le gène codant pour la néomycine acétyl transférase (*nptII*) qui confère la résistance à la kanamycine et à la néomycine. Ce gène a été utilisé comme marqueur pour le maintien et la sélection du plasmide dans les étapes permettant d'amplifier le plasmide chez les bactéries *E. coli*.

b) construction génétique introduite dans l'OGM.

Le fragment d'ADN de 6235 bp a été obtenu après amplification du plasmide PHP89999 et digestion par l'enzyme de restriction PmeI qui fournit deux fragments. Le fragment de 6235 bp comprend les gènes d'intérêt *cry1F* et *pat*.

La séquence de néomycine acétyl transférase (*nptII*), et l'origine de réplication du plasmide ne sont pas présentes sur le fragment de 6235 bp.

La recherche d'ORF potentielles dans la séquence de ce fragment (dans les 2 sens de lecture) ne révèle aucune ORF de plus de 100 pb dans les séquences des gènes *pat* et *cry1F*. Par contre une ORF potentielle de 630 bp s'étend dans le terminateur de la mannopine synthase et le promoteur 35S qui suit. Elle est dénommée ORF4.

L'insertion dans le génome du maïs est pratiquement complète (6186 bp). Par ailleurs, en 5' et en 3' par rapport à cette insertion se trouvent des séquences réarrangées (séquences de maïs et séquences de l'insert) avant les séquences d'origine du génome du maïs. Dans la région réarrangée en 5', trois ORF potentielles sont décelées (ORF 1, 2, 3). Les ORF 1 et 2 proviennent du génome d'origine du maïs, ce qui est confirmé par PCR. L'ORF 3 est une

recombinaison de séquences de *cry1F*, *rpoC2* (gène chloroplastique de maïs), *trnI* (gène chloroplastique de maïs), *pat* et antisens *pat*.

L'absence d'expression de l'ORF 3 dans les grains est bien documentée : les résultats des analyses réalisées par northern, RT PCR, western et ELISA sont négatifs. Cette ORF potentielle n'est par ailleurs associée à aucun signal de transcription et n'a pas d'homologie avec des séquences présentant des risques pour la santé.

Un faible niveau d'ARNm portant la séquence de l'ORF 4 peut être détecté. Il résulte de la présence en très petite quantité d'ARN messagers de *cry1F* ayant dépassé les signaux de fin de transcription. Il n'y a par contre aucun signe d'une protéine fusion Cry1F-ORF4 en ELISA.

Aucune information sur les ORF de taille inférieure à 100 pb n'est donnée dans le dossier.

La séquence complète de l'insert après insertion dans la plante et des zones adjacentes réarrangées n'est pas fournie. La Commission considère que celle-ci est nécessaire pour déterminer si l'insertion a lieu dans une zone codante ou non du génome du maïs, et pour identifier les gènes adjacents à l'insert.

L'analyse de Southern révèle une copie surnuméraire de la séquence codante de *cry1F*, sans promoteur ou avec un promoteur tronqué. Cette analyse ne révèle aucun signal après hybridation avec un lot de sondes couvrant complètement les régions des séquences du plasmide autres que celles contenues dans le fragment d'ADN utilisé pour le bombardement. L'analyse génétique portant sur la résistance au glufosinate et/ou aux lépidoptères ne met en évidence qu'un seul locus fonctionnel.

L'événement de transformation TC 1507 n'ajoute donc au génome du maïs que deux gènes fonctionnels : *cry1F* et *pat*.

4. Evaluation des risques pour la santé publique

4.1 pertinence des protéines utilisées dans les études toxicologiques

a) *protéine CRY1F* : la protéine est présente sous sa forme complète correspondant aux 605 codons de la construction et sous une forme où les 5 premiers résidus (N terminaux) ont été clivés par une activité trypsique endogène au maïs.

L'équivalence de la protéine CRY1F exprimée dans le maïs 1507 et dans *Pseudomonas fluorescens* est étudiée. Les analyses par MALDI TOF MS montrent que les peptides détectés sont identiques à l'exception d'un pic absent de la protéine microbienne et qui correspond au résidus 522-529. La recherche de glycosylation, bien que des sites potentiels existent sur la séquence de CRY1F, aboutit à une conclusion négative.

Cependant, aucun renseignement sur la conformation in silico des protéines n'est fourni. Or, la protéine CRY1F présente dans le maïs 1507 étant tronquée par rapport à celle utilisée pour les études toxicologiques, la Commission considère qu'une comparaison des conformations in silico des deux protéines est nécessaire pour conclure sur l'équivalence des protéines en termes de structure et d'activité.

b) *protéine PAT* : Les analyses par western détectent la protéine PAT sous sa forme prévue monomérique de 22kDa.

4.2 expression des protéines d'intérêt

Les protéines CRY1F et PAT ont fait l'objet de dosages dans différents tissus par ELISA.

La protéine CRY1F se retrouve dans tous les organes de la plante avec des concentrations variables rapportées aux protéines totales extractibles dans une gamme allant de 1.6 et 22.4 ng/mg par rapport au poids sec. Ces variations traduisent des spécificités tissulaires : la protéine est essentiellement exprimée dans la tige, les feuilles, le pollen et les grains. Les niveaux d'expression observés sur des échantillons provenant de différents sites d'expérimentation se situent dans le même ordre de grandeur pour un même tissu.

La protéine PAT n'est produite que dans les feuilles et de façon moins permanente dans la tige. Elle est absente du pollen et des grains.

4.2.1 toxicité des protéines d'intérêt

Les études de toxicité aiguë des protéines CRY1F et PAT ont été menées sur souris avec les protéines isolées de bactéries.

a) *protéine CRY1F* : une étude de toxicité aiguë réalisée sur souris avec des doses allant jusqu'à 576 mg de protéine CRY1F par kg de souris ne révèle aucun effet indésirable. Une limite inférieure de la DL 50 en est déduite.

b) *protéine PAT* : une étude de toxicité aiguë réalisée sur souris avec des doses allant jusqu'à 5 g de protéine PAT de souris par kg de souris ne révèle aucun effet indésirable. Une limite inférieure de la DL 50 en est déduite.

Par ailleurs, une étude de toxicité subchronique (90 jours) a été réalisée sur des rats (5 groupes de 24 : 12 mâles, 12 femelles) nourris avec du grain de maïs génétiquement modifié à raison de 11 ou 33 % du régime alimentaire. Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence.

En outre, une étude de tolérance alimentaire a été menée chez le poulet. 70 poulets, sur les 145 utilisés pour l'expérience, ont été nourris avec 54 % puis 57 % de maïs TC 1507, pendant 42 jours. Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence.

Cependant, le dossier n'indique pas si les grains utilisés dans les expériences de toxicité subchronique résultent de plantes traitées au glufosinate, ni les conditions agronomiques de production de ces plantes. En l'absence de cette information, les données présentées ne permettent pas de conclure sur le risque toxique de l'OGM traité avec l'herbicide.

De plus, les études de toxicité sont toutes conduites avec du grain de maïs, et aucune étude ni argument n'est avancé dans le dossier pour justifier une extrapolation des résultats à la plante entière.

En conséquence, la Commission considère que les éléments fournis dans le dossier ne permettent pas de conclure sur la toxicité du maïs 1507 utilisé en plante entière (maïs fourrage).

4.2.2 analyse du risque allergénique

La comparaison des séquences des protéines CRY1F et PAT avec des protéines allergènes connues (comparaison avec 2033 séquences pour CRY1F) n'a pas mis en évidence d'homologies de séquence.

Les études de digestibilité gastrique et intestinale mettent en évidence une dégradation rapide de la protéine PAT, mais une résistance relative de la protéine CRY1F.

Il est conclu dans le dossier à l'absence de risque allergène de ces deux protéines. Cependant, aucune justification n'est apportée sur cette conclusion, au regard du résultat de digestibilité obtenu pour CRY1F.

4.2.3 équivalence en substance

La démonstration de l'équivalence en substance du maïs génétiquement modifié a été réalisée en comparant la lignée TC 1507 avec des lignées isogéniques et des maïs " contrôle ".

Les analyses biochimiques détaillées portant notamment sur les acides aminés individuels, les minéraux, les vitamines, les sucres, les métabolites secondaires, ne révèlent pas de différences significatives au niveau de la composition des grains, que les plantes aient été traitées ou non au glufosinate.

Au niveau de la plante entière, les données globales (humidité, lipides, protéines, carbohydrates, fibres, cendres...) montrent également l'équivalence en substance.

La Commission considère qu'il n'y a pas de différences imputables à la transformation génétique autres que celles recherchées.

5. Evaluation des risques pour l'environnement

Les questions relatives à l'échappement potentiel de gènes, au traitement des repousses, à la sécurité pour les organismes non-cibles et à l'émergence de résistances et de tolérances ne se posent pas réellement dans le cadre de cette demande qui ne porte que sur l'importation des grains, et non pas sur la culture de ces maïs.

Le risque de dispersion accidentelle de graines dans la phase de transport n'est pas à exclure mais cette dispersion aurait peu d'incidence en l'absence dans la flore européenne de plantes sexuellement compatibles avec le maïs et du fait que le risque de développement de plantes de maïs en dehors des espaces cultivés est très limité.

6. Plan de surveillance

Aucune mesure de surveillance spécifique n'est prévue, au regard du risque environnemental négligeable lié à l'importation de grains de maïs génétiquement modifiés en Europe.

En ce qui concerne la surveillance générale, une information aux importateurs, industriels et utilisateurs ainsi qu'aux autorités compétents du pays importateur est proposée.

Ces propositions sont cohérentes avec l'évaluation a priori. Toutefois, la Commission considère que la surveillance générale devrait inclure un suivi du bétail alimenté avec le maïs 1507.

7. Conclusions

La Commission du génie biomoléculaire considère que l'évaluation du risque environnemental lié à l'importation du maïs TC 1507 permet de conclure à l'absence de risque pour l'environnement.

La Commission du génie biomoléculaire considère que :

- en l'absence d'information permettant d'apprécier le risque toxique lié à une rémanence éventuelle de glufosinate au niveau du grain, en interaction avec le métabolisme de l'OGM,

- en l'absence d'études et d'arguments permettant d'extrapoler au maïs fourrage les résultats des études toxicologiques obtenus avec du maïs grain,
- en l'absence d'une séquence complète de l'insert et des séquences adjacentes réarrangées, permettant de déterminer si l'insertion a eu lieu dans une séquence codante ou non, et d'identifier les gènes adjacents à l'insert,
- en l'absence d'information sur la structure tridimensionnelle de la protéine CRY1F produite par l'OGM en comparaison avec la protéine CRY1F MR872 utilisée dans les études de toxicité,
- en l'absence de justification sur l'absence de risque allergène, au regard du résultat de digestibilité obtenu pour CRY1F,

elle n'est pas en mesure de se prononcer sur les risques pour la santé en ce qui concerne le dossier de demande de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié TC 1507, décrit dans le dossier C/NL/00/10.

Le Président


Marc FELLOUS