

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 30 janvier 2020

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché,
au titre du Règlement (CE) n°1829/2003, du maïs génétiquement modifié 3272,
développé pour exprimer une alpha-amylase thermostable afin d'optimiser la production
d'éthanol, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation
humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-UK-2006-34)**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 22 octobre 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n°1829/2003, du maïs génétiquement modifié 3272, développé pour exprimer une alpha-amylase thermostable afin d'optimiser la production d'éthanol, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-UK-2006-34).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La finalité première de cet OGM n'est pas une utilisation en alimentation. Néanmoins, les co-produits de la production d'éthanol pouvant être utilisés en alimentation animale d'une part et, d'autre part, la présence de faibles traces de maïs portant l'événement 3272 dans les maïs destinés à l'alimentation humaine et animale ne pouvant être exclue, la demande d'autorisation porte sur l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003.

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission

Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux.

Dans ce cadre, le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié 3272 développé pour exprimer une alpha-amylase thermostable afin d'optimiser la production d'éthanol (dossier n° EFSA-UK-2006-34) a été évalué par l'Afssa à la demande de la DGCCRF en 2007 (saisine 2007-SA-0212). Dans son avis du 17 septembre 2007, l'Afssa adoptait les conclusions du CES « Biotechnologie » qui étaient : « *L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que ce maïs n'étant pas destiné à être consommé par l'homme, au regard notamment des données de composition chimique, de toxicité et de l'étude d'alimentarité chez l'animal cible, la consommation sporadique de produits dérivés des variétés de maïs portant l'événement de transformation 3272 ne présenterait pas de risque sanitaire pour l'homme.*

Concernant la consommation des co-produits issus de la production d'éthanol à partir de variétés de maïs portant l'événement de transformation 3272 destinés aux animaux, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que, pour s'assurer que ces co-produits présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les co-produits issus d'un maïs conventionnel, il conviendra que des données soient fournies sur la quantité et l'activité résiduelle de la protéine AMY797E dans ces co-produits. »

Depuis 2007, de nombreuses données complémentaires ont été fournies par le pétitionnaire à son initiative et à la demande de l'EFSA. Dans la perspective du vote par les États membres sur ce dossier au Comité permanent des végétaux, des animaux, des denrées alimentaires et des aliments pour animaux (CPVADAAA), section OGM, la DGCCRF a saisi de nouveau l'Anses afin qu'elle procède à l'évaluation de ces données complémentaires dans le but de déterminer si elles sont de nature à lever les réserves exprimées dans son avis relatif à la consultation initiale.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Le délai entre la consultation initiale sur le maïs 3272 et la deuxième sollicitation de la DGCCRF dans la perspective du vote au CPVADAAA étant très important (plus de 10 ans), l'Anses a choisi de procéder à une expertise de tous les éléments concernant ce maïs en ajoutant le réexamen du dossier technique de la saisine 2007-SA-0212 à l'expertise des pièces de la nouvelle saisine 2019-SA-0181.

L'expertise collective a été effectuée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 3 décembre 2019 et le 16 janvier 2020 sur la base de rapports initiaux rédigés par six rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides du panel GMO de l'EFSA (2006 et 2011) ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, un expert n'a pas pris part aux travaux et délibérations sur cette saisine en raison d'un lien d'intérêt vis-à-vis du pétitionnaire de la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs 3272.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous.

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le maïs est une culture des zones tempérées à tropicales. En 2017 (FAOStat¹), les dix premiers pays producteurs étaient les USA, la Chine, le Brésil, l'Argentine, l'Inde, l'Indonésie, le Mexique, l'Ukraine, l'Afrique du Sud et la Roumanie, qui représentaient environ 81 % de la production mondiale. Cette production était de 1 134 746 667 tonnes pour une surface cultivée de 197 185 936 hectares (dont 64 706 588 tonnes pour une surface cultivée de 8 439 542 hectares dans l'Union européenne, FAOStat¹) et en 2016, 32 % du maïs cultivé était génétiquement modifié (ISAAA², 2017).

Les plantes sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien sous forme de grains mûrs utilisés en alimentation animale ou humaine. Le maïs est également utilisé pour la production de biocarburants, de biogaz ou de bioplastique. Il est pauvre en protéines et la teneur des grains en deux acides aminés essentiels, la lysine et le tryptophane, est faible. Le grain de maïs contient des substances antinutritionnelles (acide phytique, DIMBOA³, inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine, raffinose).

Le maïs 3272 a été génétiquement modifié avec un double évènement qui lui confère l'expression de deux enzymes exogènes, l'alpha-amylase thermostable (AMY797E) et une phosphomannose isomérase (PMI).

Le gène synthétique *amy797E* code une alpha-amylase thermostable AMY797E sous le contrôle d'un promoteur qui conduit à une expression spécifique dans l'albumen du grain de maïs 3272. L'objectif de cette transformation est d'utiliser le grain de maïs 3272 comme source de l'enzyme alpha-amylase dans la production d'éthanol « broyé à sec », afin de ne pas ajouter d'enzyme produite par un micro-organisme, dans le procédé de transformation de l'amidon. Le maïs 3272 serait utilisé en mélange avec du maïs conventionnel.

La phosphomannose isomérase codée par le gène *pmi* (*manA*) catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. L'expression de cette enzyme est destinée à sélectionner les cellules de maïs transformées sur une auxotrophie. Elle permet en effet, la survie des cellules de maïs transformées dans un milieu contenant exclusivement du mannose comme source de carbone. Les cellules de maïs n'exprimant pas cette enzyme ne peuvent pas métaboliser ce sucre et ne se multiplient pas.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs 3272. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce maïs venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

² International service for the acquisition of agri-biotech applications

³ 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur une variété propriété du pétitionnaire de *Zea mays* non transgénique (variété NP2391).

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des embryons de maïs.

Des embryons immatures de maïs ont été récoltés après pollinisation et co-cultivés avec la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, portant le vecteur pNOV7013 qui contient l'ADN-T et à l'extérieur de ce dernier, les gènes de virulence d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales. Aucun plasmide assistant (helper) ni ADN entraîneur (carrier) n'a été utilisé pour la transformation.

Après cette co-culture, les embryons ont été transférés sur un milieu contenant de la ticarcilline et du nitrate d'argent (élimination des *A. tumefaciens* résiduelles). Les cals embryogènes ont ensuite été transférés sur un milieu sélectif contenant seulement du mannose comme source de carbone (sélection des cellules végétales transformées) puis sur un milieu permettant l'initiation des racines et des pousses afin d'aboutir à la différenciation de plantules (plantes T0). Ces milieux contenaient de la céfotaxime pour s'assurer de l'élimination complète des agrobactéries. Enfin, la présence de l'ADN-T dans ces plantules a été recherchée par PCR quantitative pour confirmation de la transformation.

Le plasmide pNOV7013 utilisé pour la transformation porte les deux cassettes d'expression des gènes *amy797E* et *manA* entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T.

Composant	Taille	Fonction et origine de la séquence
Promoteur de la Gzéine	677 paires de base (pb)	Promoteur d'une zéine de 27 kDa qui conduit à l'expression spécifique dans l'albumen chez <i>Zea mays</i>
<i>amy797E</i>	1383 pb	Gène chimérique de l'alpha-amylase 797GL3 thermostable obtenu à partir des séquences de trois alpha-amylases de souches de Thermococcales des genres <i>Thermococcus</i> et <i>Pyrococcus</i> (micro-organismes hyperthermophiles). De plus, la séquence comprend une séquence codant un peptide signal de 19 acides aminés de la gamma-zéine pour l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE) et une séquence codant un peptide C-terminal SEKDEL (signal de rétention dans le RE). Des substitutions de base ont aussi été ajoutées pour tenir compte de l'usage préférentiel des codons chez le maïs
PEPC9	108 pb	Intron 9 du gène de la phosphoénolpyruvate carboxylase de <i>Zea mays</i>
35S terminateur	70 pb	Séquence de terminaison de l'ARN 35S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur pour fournir une séquence de polyadénylation
Promoteur de ZmUbiIntron	1993 pb	Région promotrice du gène de polyubiquitine de <i>Zea mays</i> contenant le premier intron. Elle confère une expression constitutive chez les monocotylédones
<i>pmi</i>	1176 pb	Gène <i>manA</i> codant la phosphomannose isomérase (PMI) d' <i>Escherichia coli</i> . L'enzyme catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Elle est utilisée comme marqueur de sélection
NOS	253 pb	Séquence de terminaison du gène de la nopaline synthase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pour fournir une séquence de polyadénylation

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du maïs 3272 (génération BC4) ont été caractérisés par Southern blot et séquençage. L'analyse des résultats obtenus en 2006 montre une insertion unique de l'ADN-T dans le génome du maïs, sans séquence plasmidique hors ADN-T. En 2010, l'absence de séquence du squelette plasmidique a été vérifiée et confirmée par Southern blot sur différentes générations de maïs (hybride B1, générations BC2F1 et BC4F1).

Les amplifications par PCR suivies du séquençage de l'insert présent dans le maïs 3272 (génération BC4) mettent en évidence une identité de séquence de l'ADN-T en dehors des délétions de 23 pb de la bordure droite et de 7 pb de la bordure gauche au niveau du site d'insertion de l'ADN-T. Les amplifications par PCR suivies du séquençage des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (environ 1000 pb de chaque côté) pour le maïs 3272 (génération BC4) confirment l'absence de séquences du squelette plasmidique (plasmide hors ADN-T).

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des jonctions et sur l'ADN-T réalisées en 2006, 2010 et 2012 ne mettent en évidence aucune identité globale ou locale avec des protéines connues. De plus, la modification génétique ne semble pas avoir interrompu un gène du maïs.

Les teneurs en protéines AMY797E et PMI ont été quantifiées par ELISA dans divers tissus (feuilles, racines, pollen, grains et plantes entières) prélevés à cinq stades de développement de la plante sur deux hybrides (A et B) du maïs 3272 qui ont été cultivés au champ aux USA en 2003. Les hybrides A et B sont obtenus par croisement de la même lignée génétiquement modifiée porteuse de l'événement 3272 avec des lignées non GM de fonds génétiques différents. Un essai au champ complémentaire a été réalisé aux USA en 2007 et des quantifications par ELISA ont été réalisées pour un hybride C du maïs 3272 (fonds génétique différent des hybrides de 2003), dans les feuilles, racines et pollen au stade « anthèse » et dans les grains à maturité.

Dans les hybrides de l'essai au champ de 2003, les teneurs en protéine AMY797E ne sont pas mesurables dans le pollen et non mesurables ou très faibles dans les feuilles et les racines⁴. La protéine AMY797E est présente dans les grains aux 3 stades de développement (stade pâteux, maturité et sénescence) ainsi que dans les plantes entières en raison de la présence des grains. Les concentrations moyennes en protéine AMY797E les plus élevées sont mesurées dans les grains au stade pâteux. Ces résultats sont compatibles avec l'expression de la protéine AMY797E sous le contrôle d'un promoteur conduisant à une expression spécifique dans l'albumen du grain de maïs.

La protéine PMI est mesurable dans tous les tissus et dans la plante entière aux cinq stades de développement ce qui s'explique par une expression sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Les concentrations moyennes les plus élevées en PMI sont mesurées dans les feuilles à des stades juvéniles (pour les hybrides A et B respectivement : 17,1 et 8,8 µg/g de matière sèche au stade « cornet », 14 et 10,7 µg/g de matière sèche au stade « anthèse » et 15,8 et 11 µg/g de matière sèche au stade pâteux) ainsi que dans le pollen (17 et 18,2 µg/g de matière sèche).

⁴ Limite de détection = 0,02 µg/g de matière sèche

Le tableau ci-dessous reprend les moyennes et valeurs limites des teneurs en protéines AMY797E et PMI mesurées dans les grains aux trois stades de développement pour les deux hybrides du maïs 3272 (essai au champ de 2003) et exprimées en µg/g de matière sèche.

Stades de développement	Maïs 3272	AMY797E	PMI
Stade pâteux	Hybride A	3365 ± 780 (2286 - 4151)	0,7 ± 0,1 (0,6 - 0,8)
	Hybride B	1994 ± 228 (1749 - 2316)	1,8 ± 0,4 (1,3 - 2,2)
Maturité	Hybride A	1259 ± 303 (908 - 1562)	<0,5 (<LOQ - 0,7)
	Hybride B	1335 ± 358 (893 - 1730)	0,7 ± 0,2 (0,5 - 0,9)
Sénescence	Hybride A	1153 ± 268 (850 - 1573)	<0,5 (<LOQ - 0,5)
	Hybride B	1004 ± 322 (624 - 1380)	0,5 ± 0,2 (0,3 - 0,7)

LOQ (limite basse de quantification) pour la protéine PMI = 0,33 µg/g de matière sèche pour les grains au stade pâteux et à maturité et 0,32 µg/g de matière sèche au stade sénescence.

Dans l'hybride de l'essai au champ complémentaire réalisé en 2007, au stade « anthèse », les teneurs en protéine AMY797E ne sont pas mesurables dans le pollen, les feuilles et les racines⁵. Dans les grains à maturité, la concentration moyenne en protéine AMY797E est de 1492,41 µg/g de matière sèche (valeurs limites = 1111,68 et 1991,73). Ces résultats confirment le niveau d'expression et la localisation de la protéine AMY797E dans l'albumen du grain, observés en 2003. La protéine PMI est également présente dans tous les tissus au stade « anthèse ». Les concentrations moyennes les plus élevées se trouvent aussi dans les feuilles (17,06 µg/g de matière sèche) et le pollen (22,45 µg/g de matière sèche). Dans les grains à maturité, la concentration moyenne en protéine PMI est de 1,93 µg/g de matière sèche (valeurs limites = 1,43 et 2,34 µg/g de matière sèche).

L'analyse de ségrégation de l'insert, réalisée par PCR quantitative sur 4 générations (BC1, BC2, BC3 et BC4), permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. La stabilité génétique du locus GM du maïs 3272 a été confirmée par PCR ainsi que par Southern blot, en utilisant des plantes de 3 générations BC1, BC2 et BC3 et le ségrégant négatif de génération BC3 comme témoin négatif.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs 3272 ne soulèvent pas de question particulière liée à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine.

II.1.3. Evaluation comparative

Trois essais au champ mettant en œuvre le maïs 3272 ont été conduits en 2003-2004, 2008 et 2014. Leurs caractéristiques et les résultats obtenus sont décrits dans les différentes sections de ce chapitre.

⁵ Limites de détection = 0,051 µg/g de matière sèche dans le pollen, 5,406 µg/g de matière sèche dans les feuilles et 2,573 µg/g de matière sèche dans les racines

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Dans l'essai mené en 2003-2004, le maïs 3272 est comparé à son ségrégant négatif. En 2008, il est comparé à une variété témoin isogénique ainsi qu'à son ségrégant négatif. En 2014, il est comparé à une variété témoin isogénique et six variétés commerciales.

Le maïs 3272, son ségrégant négatif et le témoin isogénique sont des lignées hybrides de fonds génétique NP2222 x NP2391. La variété ségrégant négatif est obtenue après plusieurs rétrocroisements et autofécondation à partir du transformant initial 3272. Elle ne contient donc pas le double événement de transformation.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le maïs 3272 et son ségrégant négatif ont été cultivés aux USA sur 6 sites en 2003 et sur 7 sites en 2004 pour l'analyse de composition, et sur 8 sites en 2003 et sur 17 sites en 2004 pour les caractéristiques phénotypiques et agronomiques. Ces sites sont indiqués comme représentatifs de la production de maïs. Chaque modalité (variété génétiquement modifiée, variété ségrégant négatif) a été répétée trois fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés.

En 2008, le maïs 3272, une variété témoin isogénique et le ségrégant négatif ont été cultivés aux USA sur 6 sites pour l'analyse de composition. Chaque modalité a été répétée trois fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Le maïs 3272 et une variété témoin isogénique ont été cultivés aux USA sur 9 sites pour une analyse comparative des caractéristiques phénotypiques et agronomiques. Chaque modalité a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés.

En 2014, le maïs 3272, la variété témoin isogénique et six variétés commerciales (3 variétés par site) ont été cultivés sur 10 sites aux USA pour l'analyse de composition et pour les caractéristiques phénotypiques et agronomiques. Ces sites sont indiqués comme représentatifs de la production de maïs. Chaque modalité (variété isogénique, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés.

Les caractéristiques du plan d'expérience de 2014 respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011). Les deux autres essais réalisés antérieurement (2003-2004 et 2008) ne respectent évidemment pas ces recommandations. Le GT « Biotechnologie » a utilisé ces deux autres essais comme des sources d'information complémentaires pour l'évaluation comparative.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) pour les 3 essais réalisés (2003-2004, 2008 et 2014).

Pour l'essai de 2014, les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) réalisées avec un modèle linéaire à effets mixtes incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du maïs 3272, de la variété témoin ou des variétés commerciales de référence),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Pour l'essai de 2014, le maïs 3272 est comparé à la variété témoin isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de

type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les variables en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence. L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

Pour les 3 essais, l'analyse de composition a été réalisée sur les grains matures et le fourrage au stade pâteux (ensilage). Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2002). Le GT « Biotechnologie » estime que cette analyse est complète.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Pour les 3 essais au champ, 73 composés sont analysés dans le grain et 9 sur l'ensilage.

Dans l'essai de 2003-2004, des différences sporadiques sont observées que pour l'un ou l'autre des hybrides A et B ou sur des plantes cultivées soit en 2003 soit en 2004 entre les hybrides A et B du maïs 3272 et les hybrides A et B du témoin ségrégant négatif. Dans l'essai de 2008, quelques différences sont observées entre le maïs 3272 et le témoin isogénique et entre le maïs 3272 et le ségrégant négatif.

Les essais réalisés en 2003-2004 et en 2008 ne mettent pas en œuvre de variété commerciale. Les résultats obtenus ont été comparés à l'époque aux données industrielles présentes dans le document consensus de l'OCDE (2002) pour conclure à une équivalence.

En 2014, les mesures de 57 composés sur les 73 analysés sur les grains⁶ et des 9 composés analysés pour l'ensilage sont utilisables pour les analyses statistiques. Sur la base des résultats de l'essai mené en 2014, l'analyse combinée de l'ensemble des 10 sites d'expérimentation montre que le maïs 3272 (grains et ensilage) est équivalent aux variétés commerciales de référence sauf pour la teneur en acide férulique qui est supérieure. Elle l'est également chez le témoin isogénique et reste dans la gamme des valeurs ILSI. Cette variation n'a pas de signification biologique.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Dans l'essai de 2014, les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 10 paramètres dont 8 sont utilisables pour les analyses statistiques. Le maïs 3272 apparaît équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique.

L'essai de 2008 ne mettant pas en œuvre de variété commerciale, les résultats obtenus permettent seulement de vérifier l'absence de différence significative entre le maïs 3272 et le témoin non isogénique.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Le maïs 3272 exprimant une alpha-amylase thermostable (AMY797E) dans le grain a été développé pour être utilisé comme source d'alpha-amylase dans la production d'éthanol « broyé à sec ». L'amidon contenu dans les grains de maïs est hydrolysé en glucose. Le glucose est ensuite utilisé pour produire de l'éthanol par fermentation. L'amidon contient un mélange d'amylose (chaîne linéaire de glucose) et d'amylopectine (chaîne ramifiée de glucose). L'alpha-amylase catalyse l'hydrolyse de l'amidon par clivage interne de la liaison alpha-1,4-glucosidique de l'amylose et de l'amylopectine en dextrine (fragment d'amidon contenant de 5-50 molécules de glucose), maltose et glucose. Dans le processus de production d'éthanol « broyé à sec », le procédé se poursuit par l'hydrolyse de la dextrine en glucose. Le glucose est ensuite utilisé comme

⁶ Plus de la moitié des mesures pour 16 composés des grains étant inférieure à la limite de quantification, ces composés sont exclus de l'analyse statistique.

substrat par les levures pour produire, par fermentation, de l'éthanol. Après une étape de distillation, quatre produits finaux sont obtenus : de l'éthanol, du CO₂, des résidus solubles de grains et des résidus solides de grains. Le mélange de ces résidus correspond aux drèches de distillerie humides ou WDG (Wet distillers' grain). Les WDG après séchage deviennent les drèches de distillerie séchées avec les solubles ou DDGS (Distillers' dried grains with solubles). Les DDGS et les WDG sont des co-produits destinés à une utilisation en alimentation animale.

Des analyses de composition ont été réalisées en 2006 sur des DDGS issues d'une production technologique à partir d'un mélange du maïs 3272 et de maïs non GM (comme le propose le pétitionnaire pour la production d'éthanol avec du maïs 3272) ou à partir d'un procédé classique avec des maïs non GM et de l'alpha-amylase thermostable d'origine microbienne. En l'absence d'analyse statistique, les résultats suggèrent une similitude de composition des DDGS issues des deux modes de production d'éthanol.

Une étude en procédé pilote de production d'éthanol montre une inactivation de la protéine AMY797E dans des WDG. Dans un autre essai pilote, l'activité de la PMI n'est pas détectée dans des WDG.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, le maïs 3272 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence pour la composition des grains et de l'ensilage, ainsi que sur le plan agronomique et phénotypique à l'exception de l'expression des protéines AMY797E et PMI.

Les co-produits de la production d'éthanol sont destinés à une utilisation en alimentation animale. Les DDGS issues de la production d'éthanol à partir d'un mélange de maïs 3272 et de maïs non GM semblent présenter une composition similaire à celles produites avec un procédé classique.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Les protéines AMY797E et PMI synthétisées par le maïs 3272 montrent une faible résistance à la dégradation pepsique et trypsique (tests de digestions gastrique et intestinale simulées *in vitro*). La protéine PMI est inactivée par traitement thermique à partir de 65 °C et est présente en faible quantité dans les grains de maïs 3272. L'activité de la protéine AMY797E diminue à partir de 100 °C et n'est plus détectable à partir de 120 °C.

Pour conduire les études de toxicité, la protéine AMY797E a été purifiée à partir de grains de maïs 3272 et la protéine PMI a été produite dans *Escherichia coli*. L'équivalence de la protéine PMI produite dans *E. coli* avec la protéine PMI synthétisée dans le maïs 3272 a été démontrée.

Les études de toxicité aiguë par administration orale unique chez le rat, réalisées indépendamment pour les deux protéines, ne révèlent pas d'effet observé jusqu'à la dose de 1511 mg de protéine AMY797E/kg p.c. et de 3030 mg de protéine PMI/kg p.c.

Une étude de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours chez le rat Wistar (5 rats par sexe/traitement) a été réalisée en 2012 par gavage aux doses de 10, 55 et 550 mg/kg p.c./ jour de protéine AMY797E. Les résultats de cette étude ne semblent pas mettre en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine AMY797E jusqu'à la dose la plus forte testée. Toutefois, le nombre d'animaux par groupe est insuffisant (5 au lieu de 10).

Le pétitionnaire ne fournit pas d'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur la protéine PMI.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

En dehors des protéines AMY797E et PMI, le maïs 3272 n'est pas développé pour produire de nouveaux constituants. L'évaluation comparative entre le maïs 3272 et le témoin isogénique ne met pas en évidence de nouveau constituant dans le maïs 3272.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux dérivés du maïs 3272, en dehors des analyses réalisées sur les DDGS et les WDG décrites au paragraphe II.1.3.6.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Une étude de toxicité sub-chronique pendant 90 jours chez le rat a été menée en 2005 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Quatre groupes de 12 rats mâles et 12 rats femelles, lignée Alpk:AP_rSD ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 10 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée 3272,
- 41,5 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée 3272,
- 10 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété ségrégant négatif,
- 41,5 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété ségrégant négatif.

Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux différents groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants. Les teneurs en protéines AMY797E et PMI ont été mesurées par la méthode ELISA dans les grains de maïs et dans les différents régimes et révèlent l'existence d'un mélange à très faible proportion de grains de maïs 3272 dans les grains de la variété ségrégant négatif (variété utilisée comme témoin) (environ 0,1 %).

Les données individuelles de l'étude et les données historiques du centre investigateur sont présentées.

L'étude de toxicité subchronique conduite avec l'aliment complet chez le rat n'a pas permis de mettre en évidence d'effets toxiques, ni de modifications macroscopiques ou histologiques, imputables au traitement, dans les conditions de l'étude. Il est toutefois regrettable que le régime témoin ait contenu un mélange à 0,1 % de grains de maïs 3272 dans les grains de la variété ségrégant négatif.

Cette étude réalisée en 2005 ne suit pas les recommandations EFSA actuelles entre autres pour les points suivants :

- les régimes alimentaires testant une dose faible de maïs ne sont pas complétés par l'ajout de grains de maïs témoin permettant que le pourcentage de maïs soit équivalent à la dose forte testée,
- le protocole ne met pas en œuvre de variété commerciale,
- le nombre d'animaux par groupe est insuffisant,
- les analyses statistiques ne réalisent pas de calcul de puissance.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Les données de sécurité relatives aux protéines AMY797E et PMI et les résultats de l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat ne permettent pas de se prononcer sur l'innocuité du maïs 3272.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité des protéines nouvellement exprimées

Le potentiel allergénique des protéines AMY797E et PMI exprimées dans le maïs transgénique 3272 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2017a).

Les sources des protéines exprimées dans le maïs génétiquement modifié sont des micro-organismes hyperthermophiles des genres *Thermococcus* et *Pyrococcus* pour la protéine AMY797E et *Escherichia coli* pour la protéine PMI. Les analyses bibliographiques présentées n'évoquent pas de risque particulier pour ces sources.

Les protéines AMY797E et PMI, exprimées dans le maïs transgénique 3272, offrent une résistance faible (AMY797E) ou modérée (PMI) à la protéolyse gastrique simulées *in vitro*. Elles devraient être assez rapidement dégradées, après ingestion, par la pepsine. La dégradation de l'enzyme AMY797E paraît moins complète en présence de trypsine.

La protéine PMI est inactivée à partir de 65 °C. Sa teneur est faible dans les grains de maïs 3272. L'activité de la protéine AMY797E diminue à partir de 100 °C et n'est plus détectable à partir de 120 °C.

La protéine AMY797E est dénaturée à partir de 150 °C (mesurée en ELISA par l'immunoréactivité vis-à-vis d'anticorps polyclonaux anti-AMY797E).

La recherche d'homologies de séquences entre les protéines AMY797E et PMI et des protéines toxiques et allergéniques avérées a été effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus. Les protéines AMY797E et PMI exprimées dans le maïs génétiquement modifié 3272 ne présentent pas d'identités globales avec les allergènes de la banque AllergenOnline (version 2019), ni avec des toxines avérées ou avec les peptides immunotoxiques responsables de la maladie cœliaque.

Deux identités locales avec des protéines allergéniques sont trouvées :

- une identité locale (8 acides aminés) de la protéine AMY797E avec l'hémocyanine/arylphorine de la blatte *Periplaneta americana* (Per a 3),
- une identité locale (8 acides aminés) de la protéine PMI avec la parvalbumine Ran e 1 de grenouille (*Rana* sp.).

Selon les études complémentaires présentées par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » estime que ces identités locales ne mettent pas en évidence de risque allergique, sur la base des connaissances actuelles.

En raison du risque potentiel allergénique d'aérosols ou de particules de la protéine AMY797E par inhalation et par contact cutané-muqueux, il conviendra de prévenir le risque de sensibilisation par ces voies d'exposition chez les opérateurs sur le site de production et lors de la mise en œuvre du maïs. Le port de masque et de vêtements de protection devra être recommandé pour prévenir les sensibilisations des opérateurs.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

Le pétitionnaire rappelle, à juste titre, que le maïs n'est pas considéré comme un aliment allergénique majeur. Il ne figure pas dans la liste des allergènes dont l'étiquetage est obligatoire. Le risque allergénique du maïs transgénique est limité et *a priori* équivalent à celui des variétés de maïs conventionnelles non GM, si ce n'est un danger nouveau lié à sa forte teneur en alpha-amylase.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Les deux protéines AMY797E et PMI exprimées dans le maïs transgénique 3272 satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA et peuvent donc être considérées *a priori* comme étant peu allergéniques. Toutefois, en raison de sa bonne résistance à la dénaturation thermique, la présence de quantités importantes d'alpha-amylase AMY797E dans les grains de maïs transgénique à maturité soulève quelques interrogations concernant une allergénicité potentielle de cette enzyme vis-à-vis des consommateurs dans le cas d'une ingestion autre que sporadique.

Dans un contexte d'exposition professionnelle, l'alpha-amylase est un allergène qui a été incriminé dans des cas de sensibilisation par voie aérienne (asthme des boulangers, allergies respiratoires d'ouvriers des industries agro-alimentaires).

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

En 2005, le pétitionnaire a réalisé une évaluation nutritionnelle des grains du maïs 3272, de la variété ségrégant négatif et d'une variété commerciale (NC2004) dans l'alimentation de poulets à croissance rapide.

Le maïs était incorporé à des taux de 50 % dans les aliments de démarrage (0-21 jours), de 57 % dans les aliments de croissance (22-35 jours) et de 65 % dans les aliments de finition (36-49 jours). Des poulets mâles de souche Ross 344 et des poulets femelles de souche Ross 308 ont été élevés pendant 49 jours en parquet de 25 animaux, avec 6 parquets par sexe et par groupe.

A la fin de l'étude, les teneurs en protéines AMY797E et PMI ont été mesurées dans les grains de maïs et dans les différentes rations « démarrage », « croissance » et finition » contenant ces grains de maïs.

Pour le maïs 3272, la protéine PMI est quantifiée dans les grains de maïs (2,12 µg/g de matière sèche) et dans les 3 rations. Pour la variété ségrégant négatif et la variété commerciale, la teneur en PMI est inférieure à la LOQ dans les grains de maïs et dans les rations.

Des teneurs en protéine AMY797E sont mesurables dans les grains de maïs (1670 µg/g de matière sèche) et les rations pour le maïs 3272 mais également dans les grains de maïs (31,58 µg/g de matière sèche) et les rations pour la variété ségrégant négatif. Les teneurs en protéine AMY797E sont inférieures à la limite de quantification (<LOQ) pour la variété commerciale. Selon le pétitionnaire, les teneurs en protéine AMY797E mesurées dans les grains étiquetés « grains de la variété ségrégant négatif » et dans les rations produites avec ces grains sont dues à un mélange avec des grains du maïs 3272 qui exprime cette protéine exogène.

Le modèle statistique utilisé est un modèle linéaire avec une analyse de variance à deux facteurs (sexe et variété de maïs). Les paramètres de performance et de rendement sur carcasse mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs 3272 ne sont pas différents significativement de ceux qui sont mesurés sur les poulets nourris avec les grains de la variété ségrégant négatif ou de la variété commerciale.

L'étude sur poulets réalisée montrent que les grains issus des maïs 3272, de la variété ségrégant négatif et de la variété commerciale non génétiquement modifiée possèdent des valeurs nutritionnelles équivalentes. Toutefois, la présence de grains de la variété 3272 dans les grains de la variété ségrégant négatif (variété utilisée comme témoin) questionne la validité de cette étude.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prédiction de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Le pétitionnaire ne présente pas d'évaluation de l'exposition pour l'Homme au maïs 3272 qui est destiné à la production d'éthanol non alimentaire. Il ne présente pas non plus d'évaluation de l'exposition des animaux aux co-produits qui leur sont destinés (DDGS), démarche qui aurait été souhaitable.

II.3 Caractérisation des risques

Non documentée par le pétitionnaire.

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs 3272 ne soulèvent pas de question particulière liée à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine.

Le maïs 3272 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence pour la composition des grains et de l'ensilage, ainsi que sur le plan agronomique et phénotypique à l'exception de l'expression des protéines AMY797E et PMI.

Les données de sécurité relatives aux protéines AMY797E et PMI et les résultats de l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat ne permettent pas de se prononcer sur l'innocuité du maïs 3272.

Le risque allergénique du maïs transgénique est limité et *a priori* équivalent à celui des variétés de maïs conventionnelles non GM pour l'alimentation. Toutefois, la présence de quantités importantes de protéine AMY797E dans les grains de maïs transgénique à maturité soulève quelques interrogations concernant une allergénicité potentielle de cette enzyme vis-à-vis d'une consommation.

En raison d'un risque potentiel de sensibilisation par voie aéroportée, lié à la forte teneur en alpha-amylase du maïs 3272, le GT « Biotechnologie » recommande une protection adaptée des opérateurs.

L'étude d'alimentarité sur poulets montre que les grains issus des maïs 3272 possèdent des valeurs nutritionnelles équivalentes aux témoins. Toutefois, la présence de grains de la variété génétiquement modifiée 3272 dans les grains de la variété ségrégant négatif (variété utilisée comme témoin) questionne la validité de cette étude.

En conclusion, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur l'innocuité du maïs 3272 lors d'une consommation sporadique des grains en alimentation humaine et animale et de la consommation des co-produits par les animaux.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable sur la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs 3272 au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003. Cet avis défavorable est fondé sur le caractère incomplet ou imprécis du dossier fourni par le pétitionnaire.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

OGM, maïs 3272, alpha-amylase thermostable, AMY797E, PMI

GMO, maïs 3272, thermotolerant alpha-amylase, AMY797E, PMI

BIBLIOGRAPHIE

EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." EFSA Journal 99: 1-100.

EFSA GMO Panel. 2010. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. The EFSA Journal 2010; 8(1): 1250.

EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." EFSA Journal 9(5): 2150, 37 pp.

EFSA. 2017a. "Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants". EFSA Journal 15: 1–49.

ISAAA. 2017. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017 : Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years." ISAAA brief N° 53. ISAAA:Ithaca, NY.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE. 1998. « Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.

OCDE. 2002. "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites." Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 6. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.