

Maisons-Alfort, le 20 juin 2003

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs grain  
génétiquement modifié lignée MON 863 et d'un maïs hybride  
MON 863 x MON 810 résistants aux insectes,  
en vue de l'importation, la transformation et l'utilisation  
comme tout autre maïs, à l'exclusion de la culture,  
sur le territoire de l'Union européenne,  
au titre de la directive 2001/18/CE**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 19 mai 2003 par la Direction générale de l'alimentation d'une demande d'avis relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs grain génétiquement modifié lignée MON 863 et d'un maïs hybride MON 863 x MON 810 résistants aux insectes, en vue de l'importation, la transformation et l'utilisation comme tout autre maïs, à l'exclusion de la culture, sur le territoire de l'Union européenne, au titre de la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement - partie C-article 15. Le dossier a été déposé auprès des Autorités compétentes allemandes sous la référence [C/DE/02/9].

La demande porte sur un maïs génétiquement modifié (hybride) porteur de deux résistances à des insectes et obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifiés : MON 863 et MON 810. La lignée MON 810 est déjà autorisée en Europe par décision de la Commission 98/294/CE du 22 avril 1998 et en France par arrêté du 5 août 1998.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 19 juin 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

### Informations relatives aux deux modifications génétiques et à l'hybride

#### **Événement MON 863**

Considérant que la lignée MON 863 est porteuse du gène *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis* codant une protéine "toxique" spécifique des larves de coléoptères, en particulier le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) et également de coléoptères ravageurs des racines de maïs (*Diabrotica sp*) ;

Considérant que :

- la construction, réalisée par biolistique, est constituée d'un gène marqueur *npt II* (néomycine phospho-transférase) codant la protéine NPT II, antagoniste des antibiotiques néomycine, kanamycine, gentamycine A et B, et d'un gène codant la protéine *Cry3Bb1*,
- il y a une seule insertion et cette insertion contient une seule construction,

- l'intégrité de la construction introduite, évaluée par cartographie de restriction, a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante sur 9 générations successives,
- on ne retrouve pas de séquence correspondant au plasmide dans le génome du maïs MON 863 ;

Considérant que les éléments bordures de l'insertion ont été analysés [508 bp (paires de bases) en 5' amont dont 266 bp du promoteur 35S et 584 bp en 3' aval dont 224 bp de la partie génomique du maïs] et qu'une comparaison des éléments bordures avec des banques de données de séquences publiques semble montrer que l'insertion s'est faite dans un gène codant du côté de l'extrémité 5' pour la sous-unité 4 d'une NADH déshydrogénase ; ceci ne devrait pas induire de perturbations métaboliques majeures en raison de la présence de ce gène dans les mitochondries ;

Considérant que la protéine Cry3Bb1 diffère de 7 acides aminés par rapport à la protéine de référence Cry3Bb, lui conférant une plus grande efficacité vis-à-vis des insectes cibles ;

#### **Evénement MON 810**

Considérant que la lignée MON 810 est porteuse du gène tronqué *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* codant une protéine "toxique" spécifique des lépidoptères (*Ostrinia nubilalis*) ;

Considérant que des variétés de maïs génétiquement modifié portant l'événement de transformation MON 810 sont autorisées en Europe et en France depuis 1998 ;

Considérant qu'une comparaison des éléments bordures avec des banques de données de séquences publiques semble montrer que l'insertion s'est faite dans un gène codant une alpha zéine du maïs ; ceci ne devrait pas induire de perturbations métaboliques majeures en raison de la redondance des gènes de zéine dans le génome ;

#### **Hybride MON 863 x MON 810**

Considérant que l'hybride résulte d'un croisement conventionnel des deux lignées de maïs, MON 863 et MON 810, que son génome contient deux inserts différents, l'un correspond aux gènes *npt II* et *Cry3Bb1*, l'autre au gène tronqué *Cry1Ab* et que ce croisement n'a pas altéré la fonctionnalité des inserts ;

#### **Information relative à la présence des protéines Cry3Bb1, Cry1Ab et NPT II dans la plante**

Considérant que le dosage quantitatif des protéines exprimées a été réalisé dans des conditions expérimentales rigoureuses : dans les feuilles, le fourrage ou plante entière, le pollen, les soies, les racines, à plusieurs stades végétatifs (entre 21 et 117-125 jours de post-levée) ;

Considérant que les données analytiques recueillies au cours de deux saisons successives de culture aux USA et en Argentine sont les suivantes (exprimées en µg/g de tissu frais) :

Variété	MON 863	MON 863 x MON 810		MON 810
Protéine exprimée dans le grain	<b>Cry 3Bb1</b>	<b>Cry3Bb1</b>	<b>Cry1Ab</b>	<b>Cry1Ab</b>
Site :				
- USA (1999)	70 (49-86)	- (2)	- (2)	-
- Argentine (1999/2000)	43,7 (LD-84,1)	61,1 (38,5-83,1)	0,84 (0,63-1,2)	0,46 (0,24-0,77)

(1) LD, limite de détection; (2) Valeurs non disponibles

Considérant que les teneurs maximales en protéine Cry3Bb1, exprimées par rapport à la matière fraîche, sont observées dans le grain et le pollen mais qu'elles représentent au maximum 0,0007 % des protéines totales du grain ;

Considérant que les teneurs des deux toxines diminuent régulièrement avec le stade de végétation, en accord avec les données de Fearing<sup>1</sup> *et al.* (1997) pour la teneur en Cry1Ab d'un autre maïs résistant à la pyrale ;

Considérant cependant que la teneur en Cry3Bb1 étant de 50 à 100 fois plus élevée que la teneur en Cry1Ab, que ce soit pour le grain de maïs MON 863 ou pour l'hybride MON 863 x MON 810, afin de confirmer cette différence de teneurs importante, il conviendrait de disposer de l'ensemble des données analytiques obtenues sur le site USA en 1999 ;

Considérant que la teneur en protéine NPT II déterminée sur MON 863 et sur MON 863 x MON 810 est, dans les deux cas, toujours inférieure au seuil de détection de 0,076 µg/g de tissu frais ;

### Informations relatives à la composition chimique et à la qualité nutritionnelle du grain

Considérant que les essais, comportant plusieurs répétitions par site, ont été effectués sur deux sites, en 1999 aux USA et en Argentine en 1999/2000, que les données chiffrées disponibles, analysées statistiquement, pour le grain et le fourrage (humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, ADF<sup>2</sup>, NDF<sup>3</sup>, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, acide phytique et facteurs anti-trypsiques, métabolites secondaires : acide férulique, inositol, raffinose et acide p-coumarique) sont comparables à celles figurant dans les tables de composition pour :

- la lignée MON 863 par rapport à un témoin (contrôle), à la fois pour les essais aux USA et en Argentine,
- l'hybride MON 863 x MON 810 par rapport à un témoin pour les essais en Argentine seulement ;

<sup>1</sup> Fearing P.L., Brown D., Vlachos D., Meghin M., Privalle L. (1997). *Molecular breeding*, 3 169-176

<sup>2</sup> ADF : résidu après traitement par un détergent acide.

<sup>3</sup> NDF : teneur en paroi cellulaire estimée par le résidu obtenu à la suite d'un traitement contenant un détergent neutre.

Considérant qu'au regard de ces données, on peut formuler l'hypothèse d'une équivalence nutritionnelle du maïs MON 863 et de l'hybride MON 863 x MON 810 par rapport aux maïs témoins ;

Considérant qu'il n'existe pas de données sur la réduction éventuelle du taux de mycotoxines chez les maïs porteurs des gènes de protection contre les insectes, alors que l'on pourrait en espérer un effet favorable ;

#### **Information relative à l'utilisation de maïs portant l'événement de transformation MON 863 et à l'hybride MON 863 x MON 810**

Considérant que le maïs grain est destiné à être utilisé pour l'alimentation animale, en vue de l'importation, la transformation et l'utilisation comme tout autre maïs, à l'exclusion de la culture, sur le territoire de l'Union européenne, au titre de la directive 2001/18/CE ;

Considérant que, selon le procédé de transformation appliqué initialement au maïs (voie sèche ou humide), des produits différents destinés à l'alimentation animale sont obtenus, mais également des sous-produits tels que le tourteau de germes ou le "corn gluten feed" (dérivé protéique du grain de maïs) dans lequel on peut s'attendre à une concentration (x 6 ou 7) de la teneur en protéines nouvelles (Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPT II) dans le produit fini ;

#### **Informations relatives à la dégradation enzymatique *in vitro* et au potentiel allergénique des protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPT II**

##### ***Protéines Cry1Ab et NPT II***

Considérant que l'équivalence des protéines NPT II et Cry1Ab synthétisées par *E. coli* et extraites respectivement de MON 863 et MON 810 a été démontrée ;

Considérant que ces deux protéines (synthétisées par *E. coli*) sont rapidement dégradées en 15 secondes à deux minutes en présence d'enzymes protéolytiques en milieu acide, que ce test de dégradation a déjà été validé dans le cas de l'autorisation de l'événement MON 810 ;

Considérant que la comparaison des séquences d'acides aminés des protéines NPT II et Cry1Ab avec les séquences de protéines connues pour être allergènes (respectivement 567 et 219 protéines) ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de ces deux protéines ;

##### ***Protéine Cry3Bb1***

Considérant que l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine Cry3Bb1 synthétisée par *E. coli* et extraite de MON 863 est démontrée ;

Considérant que la protéine Cry3Bb1, extraite de la plante, comporte 653 acides aminés dont la fraction N-terminale est acétylée, mais que cette propriété n'a jamais été associée à un risque d'allergénicité, qu'elle présente une forte similitude de séquence d'acides aminés avec celle des protéines delta endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et qu'elle diffère dans sa séquence des toxines ou des protéines à activité pharmacologique connues (comparaison avec 4677 séquences protéiques) ;

Considérant toutefois que :

- la dégradation de la protéine Cry3Bb1 (synthétisée par *E. coli* ou extraite des grains de maïs MON 863) par les enzymes protéolytiques en milieu acide (fluide gastrique) est plus lente (15 minutes) que celle de la protéine Cry1Ab,
- la digestion de la protéine Cry3Bb1 (synthétisée par *E. coli*) dans un système intestinal simulé laisse, au bout de 24 heures, un polypeptide résiduel de 59 KDa qui conserve des propriétés insecticides testées sur des larves d'insectes ;

Considérant que la comparaison de la séquence des acides aminés de la protéine Cry3Bb1 avec 567 séquences de protéines connues pour être allergènes ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et 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 ;

#### **Etude de toxicité aiguë des protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPTII**

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë par voie orale chez le rat ou la souris a été réalisée avec chacune des trois protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPT II, qu'aucun effet n'a été observé aux doses testées les plus élevées (respectivement 4000, 3200 et 5000 mg/kg p.c.) ;

Considérant qu'à partir de ces doses uniques les plus élevées, des marges de sécurité pour l'alimentation fourragère des bovins sont calculées ; il convient cependant de s'interroger sur la pertinence d'un tel calcul fondé sur une donnée de toxicologie aiguë ;

#### **Etude de tolérance et de toxicité subchronique chez le rat**

##### ***Lignée MON 863***

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain MON 863 en comparaison avec un maïs "isogénique" et 6 autres variétés de maïs ;

##### ***Lignée MON 810***

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain MON 810 en comparaison avec un maïs "isogénique" ;

Considérant que, dans les deux études, les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres urinaires et sanguins ont été mesurés au cours

de l'étude, qu'au sacrifice à 90 jours, des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique de 8 organes (poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur 18 organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant qu'il est indiqué qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique, mais que, toutefois, aucune donnée chiffrée concernant cette étude ne figure dans le dossier ;

Considérant, de plus, qu'on peut légitimement s'interroger sur les taux d'incorporation choisis de 11 et 33 % dans la ration alors qu'il est possible d'en incorporer 60 % sans difficulté ;

***Hybride MON 863 x MON 810***

Considérant que l'hybride MON 863 x MON 810 n'a volontairement pas été testé pendant 90 jours chez le rat, le pétitionnaire estimant que les deux essais de toxicité sub-chronique sur chacun des maïs parents sont suffisants pour démontrer l'innocuité des produits de l'hybride ;

**Etude de tolérance et d'alimentarité chez le poulet**

***Lignée MON 863***

Considérant qu'une étude a été réalisée sur des poulets en croissance des deux sexes pendant 42 jours, consistant à étudier l'effet d'une alimentation contenant le maïs MON 863, la variété "isogénique" et 5 autres variétés commerciales de maïs non génétiquement modifié en comparant les performances de croissance, d'efficacité et de composition des muscles pectoraux et de la cuisse ;

Considérant, toutefois, que le taux d'incorporation du maïs dans l'aliment et le nombre d'animaux par traitement ne sont pas fournis ;

Considérant qu'aucune différence significative n'ayant été observée entre les résultats obtenus pour le maïs MON 863 et les autres variétés de maïs, on peut donc conclure à l'équivalence alimentaire de la nouvelle plante ;

***Hybride MON 863 x MON 810***

Considérant que l'hybride MON 863 x MON 810 n'a pas été testé chez le poulet,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que :

- il conviendrait de disposer des résultats d'analyse des études de tolérance et toxicité subchronique chez le rat, nourri avec du maïs des lignées MON 863 et MON 810, et de leurs traitements statistiques. En effet, bien qu'il soit affirmé qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et les rats recevant l'aliment contenant du maïs génétiquement modifié, en l'absence des résultats d'analyse, cette conclusion ne peut être retenue comme telle ;

- il conviendrait de disposer des compléments d'information suivants sur le protocole expérimental relatif à l'étude sur poulets en croissance : nombre d'animaux inclus dans l'étude et composition des régimes alimentaires ;
- la conclusion du pétitionnaire, qui considère l'innocuité de l'hybride MON 863 x MON 810 démontrée par les études sur chacun des parents, ne peut être retenue. Afin de vérifier l'absence d'effets néfastes ou toxiques de l'hybride, il conviendrait de réaliser une étude de tolérance et toxicité subchronique chez le rat ou une étude d'alimentarité chez le poulet en croissance ;

En l'absence des informations indiquées ci-dessus, un avis scientifiquement fondé concernant la sécurité sanitaire d'une consommation animale du maïs MON 863 et de l'hybride MON 863 x MON 810 et de leur dérivés ne peut être rendu.

En ce qui concerne la présence du gène marqueur *npt II* conférant la résistance à la kanamycine, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments soutient la position de l'Etat membre rapporteur qui s'en réfère aux travaux entrepris par la Commission européenne<sup>4</sup> sur l'utilisation de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques dans les organismes génétiquement modifiés et dont les résultats ne sont pas encore connus.

**Martin HIRSCH**

---

<sup>4</sup> En vue de la mise en œuvre de l'article 4 de la directive 2001/18/CE, un groupe de travail de la Commission a été chargé d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques qui pourraient présenter un effet néfaste sur la santé humaine et l'environnement, ceux qu'il sera nécessaire d'éliminer et ceux qui feront partie d'une liste négative.