

Maisons-Alfort, le 15 mai 2008

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs
hybride génétiquement modifié Bt11 x GA21, résistant aux lépidoptères
et tolérant au glufosinate d'ammonium et au glyphosate, pour l'importation
et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation
humaine et animale de graines et de ses produits dérivés, au titre du
règlement (CE) n°1829/2003.**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 27 février 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié Bt11xGA21, résistant aux lépidoptères et tolérant au glufosinate d'ammonium et au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines 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 (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'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 avril 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

(A) Information générale

Cette demande de mise sur le marché concerne le maïs Bt11xGA21, obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifiées :

- le maïs **Bt11** portant le gène codant la protéine Cry1Ab, toxique pour la pyrale (*Ostrinia nubilalis* ou European corn borer) et la sésamie (*Sesamia non agroides* ou Mediterranean Corn Borer) et le gène codant la protéine PAT (phosphinothricine acétyl transférase) qui confère la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium.
- Le maïs **GA21** portant le gène codant la protéine mEPSPS (5-énol pyruvyl-3-phosphoshikimique acide synthétase) mutée de maïs conférant la tolérance au glyphosate.

Les maïs portant l'événement Bt11 ont reçu une autorisation communautaire en 1998 pour l'importation et la transformation industrielle au titre de la directive 90/220/EEC (98/292/EC, JOCE L131/28). L'autorisation pour l'utilisation en alimentation humaine de ses grains et de ses dérivés a été accordée en 1999 selon l'article 5 du règlement 258/97/CE. Une demande spécifique pour l'importation en alimentation humaine du maïs doux portant l'événement Bt11 au titre du règlement 258/97/CE a fait l'objet d'une évaluation de l'AFSSA qui a rendu le 15 avril 2004, un avis réservé du à l'absence dans le dossier d'une étude de tolérance/toxicité chez le rat ou d'une étude de tolérance/alimentarité chez un animal cible réalisées à partir de maïs doux portant cet événement de transformation. L'importation du maïs doux Bt11 a été autorisée par la commission le 19 mai 2004 (2004/657/EC, JOCE L131/28). Un dossier de renouvellement d'autorisation dans le cadre des articles 11 et 23 du règlement (CE) n° 1829/2003 a été évalué par l'AESA qui a rendu un avis le 20 avril 2005 (The EFSA Journal (2007) 541, 1-25).

Enfin, il est à noter que l'AFSSA a été saisie le 9 avril 2008 d'une demande d'avis relatif au dossier de renouvellement des autorisations accordées en 1998.

Les maïs portant l'événement GA21 ont déjà fait l'objet d'une évaluation par l'AFSSA pour l'alimentation animale en 1999/2000 dans le cadre d'un dossier déposé au titre de la directive 90/220/CE et d'une évaluation pour l'alimentation humaine dans le cadre d'un dossier déposé au titre du règlement (CE) n° 258/97. Par la décision 2006/69/CE du 13 janvier 2006 (JOCE 07/02/06), la Commission européenne a autorisé la mise sur le marché d'aliments et ingrédients produits à partir de la lignée de maïs génétiquement modifié GA21, au titre du règlement 258/97/CE pour l'alimentation humaine. Une dernière évaluation a eu lieu en 2006 dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003 pour élargir aux grains et aux produits dérivés, l'autorisation de mise sur le marché d'aliments et ingrédients pour l'alimentation humaine et animale. Un avis favorable de l'AFSSA a été rendu le 15 juin 2006 puis de l'AESA le 13 septembre 2007 (The EFSA Journal 2007 541, 1-25). Les maïs portant l'événement GA21 ont été autorisés par la commission européenne le 28 mars 2008 (2008/280/EC JOCE L87/20).

Le présent avis s'appuie sur les évaluations déjà réalisées pour ces deux lignées et présentées dans les avis de l'AFSSA et de l'AESA cités ci-dessus.

(C) Informations relatives à la modification génétique

- (1) Considérant que le maïs Bt11xGA21 a été obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifié Bt11 et GA21 et qu'aucune autre modification génétique n'a été introduite dans ce maïs, il comporte les deux événements de transformation apportés par les lignées parentales.

Evénement Bt11

L'événement Bt11 résulte de la régénération de la plante entière à partir des protoplastes transformés. Le fragment de restriction *NotI*, issu du vecteur pZO1502 utilisé pour la transformation comprend une cassette permettant l'expression de la protéine Cry1Ab (issue de *Bacillus thuringiensis*) et une seconde cassette d'expression du gène *pat*.

La cassette *cry1Ab* comprend le promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur (CaMV), l'intron IVS6 du gène *adh1* de maïs, le gène *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* (optimisée dans le contexte végétal), la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthétase, la séquence de terminaison du gène NOS 3' d'*Agrobacterium tumefasciens* (T-nos).

La cassette *pat* comprend le promoteur 35S de CaMV, l'intron IVS2 du gène *adh1* de maïs, le gène *pat* (optimisée dans le contexte végétal) de *Streptomyces viridochromogenes* souche Tu494 et la séquence de terminaison du gène NOS 3' d'*Agrobacterium tumefasciens* (T-nos).

Evénement GA21

GA21 a été obtenu par biolistique d'une suspension de cellules en culture de maïs à l'aide du fragment de restriction *NotI* issu du vecteur pDPG434. Le fragment de restriction *NotI* comporte la cassette d'expression mEPSPS.

La cassette *mepsps* comprend le promoteur du gène de l'actine1 du riz (*Oryza sativa*), incluant le premier intron et le premier exon, le gène modifié *mepsps* de maïs précédée des séquences SS-SSU-CTP de tournesol et de maïs (*Helianthus annuus* et *Zea mays*) qui codent pour un peptide d'adressage dans les chloroplastes, la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthétase NOS 3' d'*Agrobacterium tumefasciens* (T-nos).

Le fragment *NotI* ne contient ni l'origine de répllication d'*E. coli*, ni le gène *bla*, ni la séquence partielle de *lacZ*.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Le maïs hybride Bt11xGA21 provient du croisement conventionnel de Bt11 et GA21. Il exprime les trois caractères suivants :

- une protéine tronquée Cry1Ab, un variant de la protéine issue de *Bacillus thuringiensis* qui apporte la résistance à certains lépidoptères tels que l'ECB (*Ostrinia nubilalis*) et le MCB (*Sesamia nonagroides*)
- la phosphinothricine acétyl transférase (PAT) issue de *Streptomyces viridochromogenes* confère la résistance aux herbicides contenant du glufosinate d'ammonium par un mécanisme de détoxification de l'herbicide.

- la mEPSPS de maïs insensible au glyphosate par la modification de deux acides aminés en position 102 (Thr→Ile) et en position 106 (Pro→Ser). La présence d'une EPSPS insensible au glyphosate s'exprimant dans les chloroplastes permet le maintien de la synthèse d'acides aminés et donc la survie de la plante lorsqu'elle est soumise à un traitement par l'herbicide.

- (2) Considérant que les analyses de type Southern, utilisant une large gamme d'enzymes de restriction et de sondes spécifiques des inserts Bt11 et GA21, montrent que les inserts présents chez l'hybride Bt11xGA21 correspondent bien aux inserts hérités de chacun des parents, que la structure moléculaire des inserts tels que décrits chez les parents est préservée chez l'hybride et que les inserts sont présents en une seule copie dans le génome nucléaire de l'hybride ;

Considérant que, l'hybride a été obtenu de manière conventionnelle et ne comporte pas d'autre modification génétique que celles des parents, il est fortement probable que l'hybride conserve les caractéristiques de chacune des lignées parentales. Ainsi, les caractéristiques moléculaires de l'ADN introduit, des régions bordures de chacune des insertions doivent se retrouver chez l'hybride ;

Considérant que l'analyse des régions flanquantes des insertions avait été réalisée chez les parents et que les résultats avaient montré :

Pour Bt11,

- 1) que l'insertion de l'insert de Bt11 avait eu lieu dans une région non transcrite du génome
- 2) qu' aucune nouvelle ORF n'a été identifiée au niveau des bordures 5' et 3'

Pour GA21,

- 1) l'insertion a eu lieu dans le génome nucléaire au niveau d'un gène codant le cytochrome C, (si l'insert a interrompu un gène nucléaire impliqué dans la biosynthèse du cytochrome C, le gène fonctionnel impliqué existant au sein du génome chloroplastique compenserait la version tronquée de ce gène dans le génome nucléaire).
- 2) la séquence de toutes les ORF potentielles détectées au niveau des bordures 3' et 5' a été comparée aux bases de données de peptides toxiques et/ou allergènes et aucune identité n'a été mise en évidence.

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

Considérant que les niveaux en protéines Cry1Ab, PAT et mEPSPS ont été estimés par ELISA dans les feuilles, les racines, les grains et le pollen à trois stades de développement. Les analyses ont été menées à partir d'échantillons de plantes Bt11, GA21, Bt11xGA21 et un maïs conventionnel cultivés aux États-Unis en 2005 (4 essais).

Considérant que les niveaux d'expression des protéines Cry1Ab et PAT dans l'hybride Bt11xGA21 sont comparables à ceux observés dans la lignée parentale Bt11 et que ceux de la protéine mEPSPS sont comparables à ceux observés dans la lignée parentale GA21.

Considérant que les teneurs moyennes mesurées dans les grains à maturité sont les suivantes :

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéines mesurées Cry1Ab, PAT et mEPSPS dans Bt11xGA21 comparées aux teneurs en protéines mesurées chez les parents Bt11 et GA21

Protéine	Evènement	Teneur en µg / g de poids frais ± écart type (gamme)
Cry1Ab	Bt11	1.00 ± 0.25 (0,78-1,18)
	Bt11 x GA21	0.98 ± 0.03(0,96-1,02)
PAT	Bt11	<0.017
	Bt11 x GA21	<0.017
mEPSPS	GA21	4.83 ± 0.22 (4,58-5,07)
	Bt11 x GA21	4.23 ± 0.42 (3,69-4,71)

(5) Informations relatives à la stabilité génétique des inserts et à la stabilité phénotypique de leurs expressions

Considérant que la présence des inserts dans l'hybride Bt11xGA21 a été vérifiée par Southern, que la stabilité phénotypique de la lignée Bt11 et de la lignée GA21 ont été vérifiées notamment par dosage des protéines Cry1Ab, PAT sur plusieurs générations issues de Bt11 et mEPSPS sur plusieurs générations issues de GA21 ;

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale

- (7.1-3) L'analyse de composition chimique a été réalisée sur un triple hybride Bt11xMIR604xGA21 issu de croisements conventionnels de trois lignées de maïs génétiquement modifié et comportant en plus des événements Bt11 et GA21, objet de la demande d'autorisation, l'événement MIR604. Ce choix est en accord avec les lignes directrices de l'AESA¹ concernant l'évaluation des doubles transformants issus du croisement conventionnel de lignées transgéniques. En effet, l'AESA permet l'évaluation sur un multi-transformant contenant un plus grand nombre d'événements dans la mesure où chacun d'eux est contenu dans le multi-transformant utilisé pour l'évaluation.

Considérant que MIR 604 est génétiquement modifié par introduction d'un gène codant une protéine Cry3A, toxique pour les coléoptères du genre *Diabrotica* et d'un gène marqueur codant une phosphomannose-isomérase. Le maïs portant cet événement a été évalué par l'AFSSA en 2005 et a reçu un avis favorable à sa mise sur le marché pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés (avis du 2 décembre 2005).

Par conséquent, l'AFSSA considère que l'analyse de composition chimique sur le triple hybride est acceptable d'autant plus que les caractères apportés par chacune des modifications génétiques n'interagissent pas ou ne concernent pas les mêmes mécanismes d'action.

Considérant que cette analyse a été réalisée à partir d'échantillons du maïs Bt11xMIR604xGA21 et témoins non transformés ont été cultivés conjointement sur 6 sites (3 répétitions par site) aux États-Unis en 2006 ;

Considérant que l'analyse de composition fourragère porte sur les éléments suivants : humidité, protéines, lipides, glucides, cendres, fibres solubles dans les détergents acides et neutres (ADF, NDF), calcium, phosphore.

Considérant que l'analyse de composition pour le grain porte sur les éléments suivants : humidité, protéines, lipides, glucides, cendres, fibres totales, fibres solubles dans les détergents acides et neutres (TDF, ADF, NDF), amidon, 10 minéraux, 7 vitamines, 18 acides aminés, 5 acides gras, 7 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels (acide férulique, acide para-coumarique, inositol, acide phytique, inhibiteur trypsique, furfural, raffinose) ;

Considérant qu'une analyse statistique de type ANOVA des paires transgéniques-non transgéniques a été appliquée pour les 6 sites et que les résultats de cette analyse ne montrent pas de différences significatives pour la composition fourragère mais montrent un effet génotype pour certains paramètres du grain (protéines, zinc et calcium, vitamine B1, acides-aminés) ;

Considérant que, d'une part, les teneurs mesurées restent dans la limite des fourchettes des tables de composition établies pour le maïs grain au niveau international (ILSI, 2006 ou OCDE²), et que, d'autre part, les teneurs en composés majeurs du grain en particulier

1 Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked events, adopted on 16 may 2007.

2 ILSI 2006 International life sciences institute crop composition database, v3.0.

les acides aminés indispensables ne diffèrent pas, l'ensemble des données présentées conduit à conclure à une équivalence en substance entre le maïs hybride Bt11xGA21 et son témoin ;

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

Considérant que l'analyse des caractères agronomiques et phénotypiques (30 caractères agronomiques et 3 caractères de résistance aux maladies) de plantes Bt11xGA21 cultivées sur 9 sites en 2005 comparés à ceux de plantes témoins montre qu'il n'y a pas de différences entre les plantes génétiquement modifiées et les plantes témoins ;

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) **Evaluation de la sécurité des protéines Cry1Ab, PAT, mEPSPS**

Considérant que la sécurité des protéines Cry1Ab et PAT a déjà été évaluée à plusieurs reprises puisqu'elles sont similaires à celles exprimées dans différentes variétés de maïs précédemment autorisées ;

Considérant les éléments suivants :

- ✓ les protéines proviennent d'espèce considérée comme sûre et ne présentant pas de potentiel pathogène,
- ✓ la présence à l'état naturel de ces protéines dans l'environnement de l'homme, y compris dans son alimentation,
- ✓ l'absence d'homologie de structure primaire de ces protéines avec des protéines toxiques connues,
- ✓ le fait que ces protéines présentent une faible toxicité au cours d'études expérimentales de toxicité par administration unique.
- ✓ l'historique ou le recul de consommation par l'homme ou l'animal de plantes génétiquement modifiées exprimant ces mêmes protéines

Considérant que la sécurité de la protéine mEPSPS a fait l'objet d'une évaluation lors de la demande d'autorisation de l'événement GA21 (avis du 22 juin 2006) dans laquelle les éléments suivants étaient présentés :

- ✓ une étude de toxicologie aiguë chez la souris où aucun effet toxique aigu n'a été observé à 2000 mg/kg p.c. ;
- ✓ un test de digestion protéolytique in vitro montre que cette protéine est rapidement dégradée en milieu acide (fluide gastrique simulé) ;
- ✓ des mesures de l'activité enzymatique montre que celle-ci disparaît après 30 minutes à 65 ° C ;
- ✓ des comparaisons de séquences avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques et qu'aucune homologie de séquence n'ont été retrouvés avec ces peptides ;

(7.8.2) **Etude de la toxicité subchronique**

Maïs BT11

Considérant qu'aucune étude de toxicité subchronique (90 jours) n'est présentée pour Bt11 ;

Considérant les résultats d'études³ publiées dans la littérature scientifique à comité de lecture réalisées chez les espèces cibles (poulets, bovins, vaches, veaux), qui ne montrent aucune toxicité ou différence d'alimentarité entre les maïs portant l'événement Bt11 et leurs témoins ;

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, N°6.

3 Brake, J. , Faust, M.A., Stein, J. 2003. Poult Sci. 82:55.

Folmer, J.D., Grant, R.J., Milton, C.T., Beck, J. 2002. J. Anim. Sci. 80:1352.

Shimada, N., Murata, H., Mikami, O., Yoshioka, M., Guruge, K.S., Yamanaka, N., Nakajima, Y. , Miyasaki, S. 2006 J.Vet. Med. Sci. 68:1115.

Maïs GA21

Considérant qu'une étude de toxicité sub-chronique (90 jours) chez le rat a été réalisée en 2004 et a été examinée par l'AFSSA au cours de l'évaluation de l'événement GA21 et qu'il avait été conclu que le traitement contenant le maïs GA21 était sans effet toxique chez le rat exposé pendant 90 jours via l'alimentation ;

(7.9) Allergénicité

Considérant que l'évaluation de l'allergénicité des protéines Cry1Ab, PAT et *mEPSPS* a été conduite et est présentée dans les dossiers de demande d'autorisation du maïs Bt11 et du maïs GA21 ;

Considérant que les résultats de cette évaluation montrent que :

- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés des protéines Cry1Ab, PAT et *mEPSPS* (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités ;
- ✓ les protéines CryAb, PAT et *mEPSPS* sont sensibles à la protéolyse par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) et qu'elles sont digérées en moins de 2 minutes ;
- ✓ l'absence de N-glycosylation de ces protéines ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation, digestion *in vitro* des protéines et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, à 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 au total avec 540 poulets (6 répétitions de 15 poulets par sexe et par traitement, 3 traitements) nourris pendant 42 jours avec deux régimes [correspondant aux périodes de démarrage (0-21 jours), de croissance et de finition 21-42 jours)] à base de maïs Bt11xGA21 (51 et 64 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin ayant le même fond génétique et une variété commerciale de maïs ;

Considérant que l'équivalence de composition chimique et les teneurs en 5 mycotoxines des rations entre le maïs Bt11xGA21 et le maïs témoin ont été vérifiées et que les dosages des protéines recombinantes montrent que Cry1Ab a une teneur comprise entre 0.24 et 0.4 µg/g, que *mEPSPS* entre 0.63 et 0.77µg/g et que PAT est non détectée ;

Considérant que les observations ont porté sur la croissance, sur l'efficacité alimentaire, sur le taux de mortalité, sur 7 paramètres de carcasse, et que le taux de mortalité enregistré (1 à 4 %) au cours de l'expérimentation est non lié au traitement ;

Considérant que les résultats, après analyse statistique, ne montrent :

- aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le maïs Bt11xGA21 et le maïs témoin ou les variétés commerciales testées pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux ;
- aucune différence, à l'issue de l'expérience, en ce qui concerne les données relatives aux caractéristiques de la carcasse (rendement à l'abattage, qualité de la viande) ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs Bt11xGA21 avec son témoin non génétiquement modifié,

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments émet les conclusions suivantes :

- Les études menées pour montrer l'équivalence de composition ont été réalisées sur le triple transformant Bt11xMIR604xGA21 et sont considérées comme extrapolables au maïs Bt11xGA21 en conformité avec les lignes directrices de l'AESA. Etant donné qu'il n'y a aucun lien de fonction connue entre les protéines apportées par chacune des transformations génétiques, l'AFSSA prend en compte ces résultats d'autant plus que l'équivalence de composition chimique entre Bt11xGA21 et son témoin est confirmée dans l'étude d'alimentarité réalisée chez le poulet.
- Bien qu'il n'y ait pas d'étude de toxicité subchronique de 90 jours chez le rongeur à partir du maïs portant l'événement de transformation Bt11, qui au moment de son évaluation n'était pas requise, l'historique de consommation de ce maïs depuis 12 ans, la connaissance acquise sur les protéines apportées par la modification génétique et les études sur animaux cibles disponibles dans la littérature scientifique à comité de lecture conduisent à considérer que le maïs portant l'événement Bt11xGA21 ne présente pas d'effets délétères liés à sa consommation.

En conséquence, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments considère que les maïs Bt11xGA21 portant les deux événements de transformation Bt11 et GA21 et leurs produits dérivés sont équivalents en substance avec leurs témoins non transgéniques et présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les maïs conventionnels et leurs produits dérivés.

Cet avis ne préjuge pas des observations qui pourraient être formulées lors de l'évaluation⁴ du dossier de renouvellement d'autorisation des maïs portant l'événement Bt11.

Mots clés : OGM, hybride, maïs Bt11, maïs GA21, résistant lépidoptères, tolérance herbicides, glufosinate d'ammonium, glyphosate.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND

⁴ Saisine 2008-SA-0092, reçu le 11 avril 2008, en cours d'examen.