

Maisons-Alfort, le 8 juillet 2008

AVIS

relatif à une demande de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié MIR604xGA21, résistant aux chrysomèles des racines et tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains 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 7 avril 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié MIR604xGA21, résistant aux chrysomèles des racines et tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003.

Conformément à ce règlement, 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 le cadre de cette procédure que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'AFSSA.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 19 juin 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 MIR604xGA21, obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifiées :

- les maïs **MIR604** portant le gène codant la protéine Cry3A, toxique pour les coléoptères comme *Diabrotica* et le gène codant une phospho-mannose isomérase (utilisé comme marqueur de transformation) conférant aux cellules de la plante génétiquement modifiée l'aptitude à cataboliser le mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.
- les maïs **GA21** portant le gène codant la protéine mEPSPS (5-énol pyruvyl-3-phosphoshikimique acide synthétase) mutée de maïs conférant la tolérance au glyphosate.

Historique des évaluations du maïs MIR604

Une demande d'autorisation de mise sur le marché des maïs portant l'événement MIR604 au titre du règlement CE N°1829/2003 a été déposée auprès de l'AESA (EFSA-GMO-UK-2005-11). Dans ce cadre l'AESA a demandé l'avis de la France et le dossier a été examiné par l'AFSSA qui a rendu un avis favorable le 2 décembre 2005.

Historique des évaluations du maïs GA21

Les maïs portant l'événement GA21 ont fait l'objet de plusieurs évaluations par l'AFSSA au titre de la directive 90/220/CE, des règlements (CE) N°258/97 et N°1829/2003. L'avis AFSSA, le plus récent (15 juin 2006) concluait à un même niveau de sécurité sanitaire entre les maïs portant l'événement GA21 et les variétés de maïs conventionnelles. La mise sur le marché des maïs portant l'événement GA21 a été autorisée par la commission européenne le 28 mars 2008 pour une utilisation en alimentation humaine et animale.

En conséquence, le présent avis s'appuie sur les évaluations précédentes :

- des variétés parentales portant l'événement de transformation MIR604,

- des variétés parentales portant l'événement de transformation GA21.

Certains points de l'évaluation ne seront pas repris dans cet avis car ils figurent dans les avis relatifs à la demande d'autorisation de mise sur le marché des variétés parentales (avis du 2 décembre 2005 et du 22 juin 2006).

(C) Informations relatives à la modification génétique

Les maïs MIR604xGA21 sont obtenus par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifié MIR604 et GA21. Aucune autre modification génétique n'a été introduite dans ce maïs, il comporte les deux événements de transformation apportés par les lignées parentales.

La description des événements MIR604 et GA21 est, respectivement, détaillée dans les avis du 2 décembre 2005 et du 22 juin 2006.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(1) Les maïs hybrides MIR604xGA21 expriment les trois protéines suivantes :

- la protéine Cry3A de maïs, comportant une séquence synthétique codant une version modifiée du gène *cry3A* de *Bacillus thuringiensis*, qui apporte la résistance aux coléoptères du genre *Diabrotica*, comme la chrysomèle des racines,
- la phospho-mannose isomérase (PMI) issue du gène *pmi* du colibacille, cette enzyme permet la sélection des plantes transformées sur milieu contenant uniquement du mannose comme source de carbone,
- l'enzyme 5-énoypyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS) de maïs tolérant au glyphosate par la modification de deux acides aminés en position 102 (Thr→Ile) et 106 (Pro→Ser). La présence de cette EPSPS insensible au glyphosate et s'exprimant dans les chloroplastes, permet le maintien de la synthèse d'acides aminés aromatiques et donc la survie de la plante lorsqu'elle est soumise à un traitement par l'herbicide.

(2) L'analyse comparée des profils de type Southern réalisés à partir de l'ADN génomique des maïs hybrides MIR604xGA21 et à partir de l'ADN génomique des lignées parentales MIR604 et GA21, utilisant des sondes spécifiques des inserts, montre que les maïs MIR604xGA21 ont maintenu le même nombre, la même structure et la même organisation des transgènes que dans les variétés parentales MIR604 et GA21. Chacun des transgènes existe à un seul locus dans leur génome nucléaire respectif.

L'analyse des régions flanquant les insertions avait été réalisée chez les lignées parentales MIR604 et GA21 (cf. avis des 2 décembre 2005 et 22 juin 2006). Etant donné que les maïs MIR604xGA21 conservent la même organisation génétique que les parents, il n'est pas nécessaire de répéter cette analyse chez les variétés hybrides.

(3) Informations relatives à l'expression des produits des transgènes.

Les niveaux en protéines Cry3A, PMI et mEPSPS ont été mesurés 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 variétés de maïs MIR604, de maïs GA21, et des maïs hybrides MIR604xGA21 portant les 2 événements ainsi que dans les maïs témoins (ségrégeants négatifs correspondants). Ces maïs ont été cultivés conjointement aux États-Unis en 2005.

Les valeurs maximales sont mesurées dans les feuilles jeunes pour Cry3A (36 µg/g de poids sec), dans les feuilles et les racines jeunes pour PMI (5-6 µg/g de poids sec), dans les feuilles pour mEPSPS (32 µg/g de poids sec).

Une analyse de variance des données visant à comparer le niveau d'expression des protéines recombinantes dans l'hybride et dans la lignée parentale n'a pas mis en évidence de différence importante.

Les teneurs moyennes mesurées dans les grains à maturité sont les suivantes :

Tableau 1 : Teneurs moyennes en protéines Cry3A, PMI et mEPSPS mesurées dans les grains de maïs MIR604, GA21 et MIR604XGA21.

Protéine	Evènement	Teneur en µg/g de poids sec (étendue des valeurs)
Cry3A	MIR604	0,48 (0, 33-0,79)
	MIR604XGA21	0,45 (0, 37-0,52)
PMI	MIR604	1,6 (1,2-2)
	MIR604XGA21	1,5 (1,2-1,7)
mEPSPS	GA21	3,3 (2,8-3,6)
	MIR604XGA21	2,7 (2,4-3,0)

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

La présence des inserts dans les hybrides MIR604xGA21 par Southern et la stabilité phénotypique de la lignée MIR604 et de la lignée GA21 ont été vérifiées.

L'hybride MIR604xGA21 est produit à partir des lignées MIR604 et GA21 ; les grains qui en sont issus (génération F2) sont destinés à la transformation industrielle et à l'alimentation humaine et animale.

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

(7.1-3) Les équivalences en substance entre la lignée portant l'évènement MIR604 et son témoin et entre la lignée portant l'évènement GA21 et son témoin ont été démontrées (cf. avis du 2 décembre 2005 et du 22 juin 2006).

L'analyse de composition chimique visant à montrer l'équivalence substantielle des hybrides MIR604xGA21 a été réalisée sur les maïs comportant 3 événements de transformation « Bt11xMIR604xGA21 » issu du croisement conventionnel de maïs génétiquement modifiés et comportant en plus des événements MIR604 et GA21, l'évènement de transformation Bt11¹. Ce choix est en accord avec les lignes directrices de l'AESA² concernant l'évaluation des doubles transformants issus du croisement conventionnel de lignées transgéniques. En effet, l'AESA accepte l'évaluation sur un multi-transformant contenant un plus grand nombre d'évènements dans la mesure où chacun d'eux est contenu dans le multi-transformant utilisé pour l'évaluation.

Par conséquent, l'Agence française de sécurité des aliments considère que l'analyse de composition chimique sur le maïs comportant 3 événements de transformation Bt11, MIR604 et GA21 est acceptable d'autant plus que les caractères apportés par chacune des modifications génétiques n'interagissent pas.

Cette analyse a été réalisée à partir d'échantillons de maïs Bt11xMIR604xGA21 et de maïs témoins non transformés cultivés conjointement sur 6 sites (3 répétitions par site) aux États-Unis en 2006. L'analyse de composition fourragère a porté sur les éléments suivants : humidité, protéines, lipides, glucides, cendres, fibres solubles dans les détergents acides et neutres (ADF, NDF), calcium, phosphore. L'analyse de composition pour le grain a porté 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 anti-nutritionnels (acide férulique, acide para-coumarique, inositol, acide phytique, inhibiteur trypsique, furfural, raffinose).

Une analyse statistique de type ANOVA des paires transgénique- non transgénique a été appliquée pour les 6 sites et les résultats de cette analyse ne montrent pas de différence

¹ Les maïs Bt11 portent le gène codant la protéine Cry1Ab, toxique pour la pyrale et la sésamie et le gène codant la protéine PAT (phosphinothricine acétyl transférase) qui confère la tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium. Les maïs Bt11 ont reçu un avis favorable au renouvellement de leur autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine et animale de leurs grains et de leurs produits dérivés (avis du 3 juin 2008).

² EFSA 2006 Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events, The EFSA Journal (2007) 512, 1-5.

significative 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 et OCDE 2002³) et que, d'autre part, les teneurs en composés majeurs du grain en particulier les acides aminés indispensables ne diffèrent pas, l'ensemble des données présentées conduit à conclure à une équivalence en substance entre les maïs hybrides MIR604xGA21 et les maïs témoins.

(7.7) **Marge d'exposition**

Compte tenu des niveaux d'expression respectifs des protéines Cry3A, PMI et mEPSPS dans les grains, de la consommation de maïs en Europe, et considérant le cas maximal (où 100% du maïs consommé serait le maïs MIR604xGA21), la consommation quotidienne de Cry3A, PMI et mEPSPS serait respectivement de 0,9, 2,8 et 5,2 µg/kg de poids corporel.

7.8) **Toxicologie**

(7.8.1-2) **Evaluation de la sécurité des organismes donneurs et des protéines Cry3A, PMI et mEPSPS**

Les organismes donneurs des séquences codantes sont *Bacillus thuringiensis* pour Cry3A, *E. coli* pour PMI et le maïs (*Zea mays*) pour mEPSPS. D'autres séquences en particulier régulatrices proviennent d'*Agrobacterium tumefaciens*, du riz (*Oriza sativa*), du tournesol (*Helianthus annuus*). Tous ces organismes sont largement répandus dans l'environnement et pour certains dans l'alimentation humaine et animale.

La sécurité des protéines a déjà été évaluée lors de l'examen de la demande d'autorisation des variétés parentales MIR604 et GA21 (cf. avis du 2 décembre 2005 et du 22 juin 2006).

Les valeurs des doses sans effet toxique issues des études de toxicité aiguë sont rappelées dans le tableau 2.

Tableau 2 : doses des protéines Cry3A, PMI et mEPSPS administrées chez les rongeurs sans létalité.

	Dose de protéine administrée	Pureté de la protéine
CRY3A (1)	2632 mg/kg p.c.	90,30%
MIR604-PMI (1)	5050 mg/kg p.c	61%
MEPSPS (2)	2000 mg/kg p.c.	99%

(1) étude présentée dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché des variétés de maïs portant l'événement MIR604

(2) étude présentée dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché des variétés de maïs portant l'événement GA21

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

Une étude de toxicité sub-chronique a été réalisée chez le rat à partir des lignées parentales de maïs portant l'événement MIR604 et GA21.

Les éléments principaux de ces études sont indiqués dans les avis de l'AFSSA du 2 décembre 2005 et du 22 juin 2006. Les résultats permettent de conclure que l'ingestion de grain de maïs portant les événements de transformation MIR604 ou GA21 est sans effet toxique chez le rat exposé pendant 90 jours via l'alimentation.

³ ILSI 2006 International life sciences institute crop composition database, v3.0.

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.

Etant donné que :

- l'expression des protéines Cry3A, PMI et mEPSPS fait intervenir des cibles moléculaires et des voies métaboliques suffisamment différenciées pour qu'aucune interaction ne puisse être suspectée,
- le niveau d'expression des protéines, produits des transgènes, ne diffère pas significativement entre hybride et parents,

il n'apparaît pas nécessaire de disposer d'une étude de toxicité sub-chronique chez l'hybride portant les 2 événements de transformation.

(7.9) **Allergénicité**

L'évaluation de l'allergénicité des protéines Cry3A, PMI et mEPSPS a été conduite et présentée dans les dossiers de demande d'autorisation du maïs MIR604 et du maïs GA21 (cf. avis des 2 décembre 2005 et 22 juin 2006).

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Une étude d'alimentarité a été réalisée avec 540 poulets (6 répétitions de 15 poulets par sexe et par traitement, 3 traitements) nourris pendant 43 jours avec trois régimes successifs (correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition) contenant respectivement environ 50%, 57% et 62% de grain de maïs MIR604xGA21 en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec des grains de maïs témoin (hybride ségrégeant négatif pour les 2 événements) et d'une variété commerciale de maïs. Les plantes sont cultivées conjointement aux USA en 2005 dans des conditions de culture standard. On a de plus comparé les maïs MIR604xGA21 issus de plantes traitées ou non au glyphosate.

L'équivalence de composition chimique (5 paramètres proximaux, 13 acides aminés) des grains de maïs MIR604xGA21, des grains des maïs témoins ainsi que des différentes rations a été vérifiée. Les teneurs en 5 mycotoxines ont été mesurées et comme habituellement observé, elles sont plus faibles dans les maïs génétiquement modifiés. Les dosages des protéines recombinantes ont été déterminés et les teneurs moyennes mesurées sont : inférieures à la limite de détection pour Cry3A, 1,73 µg/g de grain pour PMI et 3,16 µg/g de grain pour mEPSPS.

Les observations ont porté sur 4 mesures de croissance, sur 10 données d'efficacité alimentaire, sur le taux de mortalité enregistré au cours de l'expérimentation qui ne montre pas de lien avec le traitement (moyen 8%) et sur 7 données de découpe pour les 2 sexes.

Considérant que les résultats, après analyse statistique, montrent :

- ✓ un effet sexe sur le poids vif et sur le taux de mortalité, (le taux de mortalité anormalement élevé chez les males étant expliqué par un stress thermique survenu au cours de l'expérience),
- ✓ aucune différence entre les groupes d'animaux nourris à base de maïs MIR604xGA21 issus de plantes traitées ou non au glyphosate, de maïs témoin ou de la variété commerciale pour ce qui concerne l'ensemble des paramètres observés.

Sur la base de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs MIR604xGA21 avec son témoin non génétiquement modifié.

Il convient de rappeler que des expériences similaires ont été menées à partir des variétés parentales génétiquement modifiées MIR604 et GA21, des maïs portant 2 événements de transformation Bt11xGA21 et Bt11xMIR604. Ces études concluent à l'équivalence alimentaire de ces variétés génétiquement modifiées et des variétés de maïs conventionnelles.

Conclusion de L'Agence française de sécurité des aliments :

Les maïs hybrides Bt11xMIR604 expriment simultanément trois protéines codées par les gènes situés sur les deux inserts correspondant aux événements de transformation MIR604 et GA21. Les protéines Cry3A, PMI et mEPSPS agissent dans des voies métaboliques différentes, ne laissant suspecter aucune interaction entre les produits des transgènes.

Les études menées pour évaluer l'équivalence de composition ont été réalisées sur les maïs Bt11xMIR604xGA21 comportant 3 événements de transformation. Etant donné qu'il n'y a aucun lien de fonction connue à ce jour entre les protéines apportées par chacune des transformations génétiques, l'AFSSA, tout comme l'AESA prend en compte ces résultats.

Le risque toxicologique (y compris la toxicité sub-chronique de l'aliment chez l'animal de laboratoire) a été considéré dans les demandes de mise sur le marché des lignées parentales. Les résultats observés sur chacune des variétés parentales permettent d'estimer que les hybrides MIR604xGA21 ne présentent pas de risque pour l'homme et l'animal.

Les résultats de l'étude d'alimentarité chez le poulet menée à partir des maïs MIR604xGA21, montrent qu'il y a équivalence nutritionnelle entre les maïs hybrides portant les deux événements de transformation et les variétés de maïs non modifiées ou conventionnelles.

En conséquence, l'Agence française de sécurité des aliments considère que les variétés de maïs portant les deux événements de transformation MIR604 et GA21 et leurs produits dérivés présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les variétés de maïs conventionnelles et leurs produits dérivés.

Mots clés : OGM, hybride, maïs GA21, maïs MIR604, résistance aux chrysomèles, Phospho-Mannose Isomérase, tolérance au glyphosate.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND