



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Maisons-Alfort, le 22 octobre 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché du maïs hybride génétiquement modifié Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, résistant à des insectes et tolérant à des herbicides, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 21 juillet 2009 par la Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché du maïs hybride génétiquement modifié Bt11xMIR162xMIR604xGA21, résistant à des insectes et tolérant à des herbicides, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-DE-2009-66).

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs) 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 états-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 25 septembre 2009, l'Agence française de sécurité des aliments émet l'avis suivant en reprenant les sections telles que définies dans les lignes directrices :

(A) Information générale

Cette demande est une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés. Elle ne concerne pas sa mise en culture dans l'Union Européenne.

Les maïs Bt11xMIR162xMIR604xGA21 sont des hybrides, ils comportent quatre événements obtenus par croisement de deux lignées portant chacune deux événements (Bt11xMIR604 et GA21xMIR162). Ils possèdent donc les caractères agronomiques apportés par :

- **Bt11**, toxique pour la pyrale (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie (*Sesamia nonagroides*) et tolérant au glufosinate ammonium.
- **MIR162** toxique pour la chenille de l'épi (*Heliothis zea*), la noctuelle Ipsilon (*Agrotis ipsilon*), le légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*) et le vers gris (*Striacosta albicosta*).
- **MIR604** toxique pour les chrysomèles des racines (coléoptères *Diabrotica*).
- **GA21** tolérant au glyphosate.

Les insectes *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis zea* et *Striacosta albicosta* ne sont pas présents en Europe, ils sont représentatifs de la faune déprédatrice du maïs du continent américain. En revanche, des lépidoptères européens dommageables sur feuilles ou épis tels que *Mythimna unipuncta* et *Heliothis armigera* sont aussi des cibles des toxines Cry1Ab et VIP3Aa20.

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

Tableau 1 : gènes recombinants et caractères apportés par les événements de transformation parentaux compris dans les maïs hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21

Événement	Gènes	Résistance aux insectes	Tolérance Herbicide ou marqueur de sélection
Bt11	<i>cry1Ab</i> <i>pat</i>	Pyrale et sésamie -	- Glufosinate d'ammonium
MIR162	<i>vip3Aa20</i> <i>pmi</i>	Chenilles de l'épi (dont <i>Héliothis armigera</i>), noctuelles Ipsilon, légionnaires d'automne et vers gris	- Phospho-mannose isomérase
MIR604	<i>cry3A</i> <i>pmi</i>	Chysomèles des racines	- Phospho-mannose isomérase
GA21	<i>m epsps</i>	-	glyphosate

Évaluation des maïs comportant les événements parentaux (simples et multiples)

Trois des maïs parentaux à l'origine de l'hybride ont déjà été évalués dans le cadre d'une demande de mise sur le marché européen au titre du règlement CE N°1829/2003 ainsi que leurs hybrides comportant 2 ou 3 événements de transformation.

Le tableau 2 synthétise les informations relatives à l'évaluation de l'AFSSA et de l'AESA des événements simples Bt11, MIR604 et GA21. Certains de ces maïs sont autorisés par la commission européenne pour une utilisation en alimentation humaine et animale.

Tableau 2 : évaluations françaises et européennes et autorisations des événements de transformation parentaux.

Maïs	AFSSA	AESA	Commission Européenne
Bt11	Avis favorable alimentation animale en 1998 (SCP) Avis favorable pour son renouvellement le 3/06/08. 2008-SA-0092	Avis favorable le 28 janvier 2009 Dossier renouvellement EFSA-GMO-RX-Bt11 <i>EFSA Journal (2009) 977,1-13</i>	Autorisé le 22/04/98 <i>JOCE du 5/05/98 L131/28.</i> Autorisé (maïs doux) le 19/05/04 <i>JOCE du 19/05/04 L300/48.</i>
MIR604	Avis favorable le 02/12/05 2005-SA-0307	Avis favorable le 2/07/09 Dossier EFSA-GMO-UK-2005-11 <i>EFSA Journal (2009) 1193,1-26</i>	
GA21	Avis favorable le 15/06/06 2006-SA-0131	Avis favorable le 13/09/07 Dossier EFSA-GMO-UK-2005-19 et EFSA-GMO-RX-GA21 <i>EFSA Journal (2007) 641,1-25</i>	Autorisé le 28/03/08 <i>JOCE du 29/03/08 L87/19.</i>

Evaluation des hybrides

Tous les maïs hybrides comportant deux ou trois événements de transformation à savoir : Bt11xGA21, MIR604xGA21, Bt11xMIR604 et Bt11xMIR604xGA21 ont été évalués par l'AFSSA en 2008. L'AFSSA a donné un avis favorable à leurs mises sur le marché pour l'importation et la transformation de l'OGM ainsi que pour l'utilisation en alimentation humaine et animale dans le cadre du règlement CE N°1829/2003¹.

¹ Avis du 15 mai 2008, saisine 2008-SA-0041 ; Avis du 10 juin 2008, saisine 2008-SA-0094 ; Avis du 08 juillet 2008, saisine 2008-SA-0093 ; Avis du 14 novembre 2008, saisine 2008-SA-0285.

Le présent avis s'appuie sur les évaluations précédentes des maïs portant un ou plusieurs événements de transformation évoqués ci dessus. Cependant le maïs hybride, objet de la demande, comporte aussi l'événement MIR162 qui n'a jamais fait l'objet de demande d'autorisation de mise sur le marché dans l'union européenne. Cet avis considère donc les informations concernant l'événement MIR162 et les points spécifiques de la présence, dans la même plante, des quatre événements de transformation.

(C) Informations relatives à la modification génétique

Les maïs hybrides, objet de cette demande ont été obtenus par croisement conventionnel de maïs transformés. Aucune autre modification génétique n'a été introduite dans l'hybride. La description moléculaire des événements Bt11, MIR604 et GA21 est détaillée, respectivement, dans les avis du 3 juin 2008, du 2 décembre 2005 et du 15 juin 2006.

L'événement MIR162 a été produit par transformation d'embryons de maïs immature à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide utilisé contient un ADN-T dans lequel sont intégrées les cassettes d'expression des protéines VIP3Aa20 et PMI.

La cassette **VIP3Aa20** comprend : le promoteur (expression constitutive) et le premier intron du gène de maïs codant l'ubiquitine, le gène *vip3Aa19* issu du gène *vip3Aa1* de *Bacillus thuringiensis* dans une version optimisée pour une expression chez les végétaux, l'intron 9 du gène codant la phospho-enol pyruvate carboxylase de maïs, le terminateur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou fleur.

La cassette **PMI** comprend le promoteur et le premier intron du gène de maïs codant l'ubiquitine, le gène du colibacille codant la phosphomannose isomérase, le signal de terminaison de transcription du gène codant la nopaline synthétase.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(1) Les maïs hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21 expriment les six protéines suivantes :

- la protéine tronquée Cry1Ab, un variant de la protéine issue de *Bacillus thuringiensis* ;
- la protéine VIP3Aa20 (Vegetativ Insectidal Protein²) qui diffère par deux acides aminés (M 129I et K284G) de la protéine native VIP3Aa1 issue de *Bacillus thuringiensis* ;
- la phosphinothricine acétyl-transférase (PAT) issue de *Streptomyces viridochromogenes* ;
- la protéine mCry3A de maïs, comportant une séquence synthétique codant une version modifiée du gène *cry3A* de *Bacillus thuringiensis* ;
- la phospho-mannose isomérase (PMI) issue d'*Escherichia coli*, enzyme catalysant l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate ;
- la mEPSPS de maïs insensible au glyphosate par la modification de deux acides aminés en position 102 et 106 (P102S ; T106I).

(2) L'insert présent dans les maïs MIR162 a été entièrement séquencé. L'analyse des profils Southern à partir de maïs MIR162 montre que l'insert présent dans ces maïs est unique et correspond à l'ADN-T du plasmide de transformation. Suite au séquençage de l'insert, deux mutations ponctuelles ont été détectées dont l'une conduit au changement de l'acide aminé 129 (l'autre étant muette).

Des hybridations de type Southern utilisant un nombre suffisant d'enzymes de restriction couvrant les transgènes ont été effectuées sur l'ADN du maïs Bt11xMIR162xMIR604xGA21 et les profils d'hybridations ont été comparés avec ceux obtenus à partir de l'ADN de chacun des parents et de leurs témoins quasi-isogéniques. De plus un ADN témoin provenant des

² Contrairement aux protéines CRY qui sont produites dans les spores de *Bacillus thuringiensis*, les protéines Vip sont produites pendant la phase végétative de croissance bactérienne et sécrétées dans l'environnement. Leur mode d'action est voisin de celui des protéines CRY. Après ingestion, elles sont clivées en fragments d'environ 66kDa qui se lie aux récepteurs de l'intestin des insectes sensibles. Ces récepteurs sont distincts de ceux ciblés par les protéines CRY. Le mode d'action est ensuite similaire, la formation de canaux ioniques dans les cellules des membranes épithéliales entraîne la lyse des cellules et la mort.

mais hybrides issus des deux lignées portant les différents transgènes parents mais ne contenant par les événements de transformation a été utilisé. L'analyse et la comparaison des profils d'hybridation démontrent que les insertions sont intégrées dans le maïs Bt11xMIR604xMIR162xGA21.

Il est à noter que les deux gènes *pmi* présents dans le génome des maïs MIR604 et MIR162 diffèrent uniquement de 2 paires de base et qu'une même sonde peut être utilisée pour les détecter conjointement.

La stabilité des quatre constructions ayant déjà été démontrée, l'hybride conserve les caractéristiques de chacune des lignées parentales. Ainsi, les caractéristiques moléculaires des inserts et des régions de jonctions se retrouvent chez l'hybride. La caractérisation de ces régions pour les événements MIR604, GA21 et Bt11 est présentée dans les dossiers relatifs aux demandes de mise sur le marché des lignées parentales transformées (cf avis du 02/12/05 saisine 2005-SA-0307, avis du 15 juin 2006 saisine 2006-SA-0131, avis du 3 juin 2008 saisine 2008-SA-0092).

De plus, les analyses du site d'insertion et des régions bordant les inserts dans les maïs Bt11, MIR604 et GA21 ont été complétées et réactualisées en mars 2008 (Bt11) et septembre 2008 (MIR604 et GA21). Ces analyses avaient pour objectif de rechercher, dans la séquence 5' et 3' bordant l'insert, les ORF putatifs entre 2 codons stop. Les résultats montrent que ces séquences protéiques chimériques ne présentent pas d'homologie avec des toxines, des allergènes ou peptides ayant une activité biologique.

Concernant l'événement de transformations MIR162, le site d'insertion et les régions bordant l'insert ont fait l'objet d'analyses présentées dans le dossier. Ainsi la région d'insertion de MIR162 a été entièrement séquencées et montre que l'insert est tel qu'attendu avec une délétion partielle des bordures de l'ADN-T. La région 5' présente des homologies avec un élément transposable du maïs 500pb en amont du site d'insertion. La région 3' présente une homologie de séquence avec le gène codant une cyclophiline de maïs mais l'insertion se situe en dehors de la partie codante et des régions régulatrices du gène. Une recherche de séquence comprise entre un ATG et un codon stop n'a pas permis d'identifier de phase de lecture ouverte au niveau des jonctions 5' et 3'. Une seconde recherche de séquence entre deux codons stop a permis d'identifier 12 séquences, aucune de ces séquences chimériques ne présente d'homologie avec des toxines, des allergènes ou peptides ayant une activité biologique.

(3) Informations relatives aux produits d'expression des transgènes

Les produits d'expression du transgène présent dans les maïs MIR162 ont été analysés dans trois études comparatives indépendantes (MIR162/témoin, Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21/témoin et Bt11 x MIR162 x GA21/témoin).

Expression dans les maïs MIR162

Une étude a été menée à partir d'échantillons de maïs portant l'événement de transformation MIR162 et cultivés en 2005 aux Etats-Unis. Les concentrations en protéines VIP3Aa20 et PMI ont été mesurées par ELISA dans les feuilles, les racines, les grains, les tiges, les soies, le pollen et la plante entière à 4 stades de développement de deux hybrides contenant l'événement MIR162 et comparées à celles de plantes contrôles (quasi-isogénique). Les deux protéines sont détectées dans tous les tissus et leurs niveaux sont similaires dans les deux hybrides. Le niveau maximum de VIP3Aa20 est retrouvé dans les feuilles au stade maturité des grains (de 95 à 148 µg/g de poids sec). Dans les grains à maturité, VIP3Aa20 s'accumule à une concentration maximale de 50 µg/g de poids sec. Les niveaux de PMI quant à eux sont au maximum de 10µg/g de poids sec dans les feuilles et de 2 µg/g de poids sec dans les grains.

Expression dans les maïs Bt11xMIR604xMIR162xGA21

Les niveaux de protéines CRY1Ab, PAT, VIP3Aa20, mCRY3A, PMI et mEPSPS ont été mesurés par ELISA dans les feuilles, les racines, le pollen et la plante entière au stade anthère et dans les grains à maturité. Les analyses ont été menées à partir d'échantillons de plantes portant les événements simples Bt11, MIR162, MIR604 et GA21 et les plantes hybrides portant les 4 événements de transformations cultivées conjointement aux Etats-Unis en 2006.

Les résultats obtenus sur les grains de maïs (tableau 3) montrent que les niveaux d'expression des protéines VIP3Aa20, mCry3A et mEPSPS dans l'hybride ne sont pas significativement différents de ceux mesurés dans les lignées parentales. Le niveau d'expression de Cry1Ab est légèrement mais significativement ($p=0.029$) plus faible dans les grains de l'hybride que dans les grains des lignées parentales. Le niveau d'expression de la protéine PMI est plus élevé chez l'hybride. Aucun test statistique n'a pu être réalisé pour cette protéine mais ce niveau plus élevé peut s'expliquer par la présence de 2 copies du gène chez l'hybride, une provenant de l'événement MIR604 et l'autre provenant de l'événement MIR162. Les écarts-type pour chaque série de données auraient du être calculées et présentées.

Tableau 3 : Teneurs moyennes en protéines Cry1Ab, PAT, VIP3Aa20, mCRY3A, PMI et mEPSPS dans les grains de maïs Bt11xMIR162xMIR604xGA21 et dans les lignées parentales.

	CRY1Ab	PAT	Vip3Aa20	mCRY3A	PMI	mEPSPS
Événement	En µg/g de poids sec (moyenne et étendue)					
simple	1,782* 1,19-2,31	Non détectée	123,8 54,25-165,94	0,717 0,19-1,11	2,48 1,08-3,16	5,34 3,62-7,61
Bt11xMIR162 xMIR604xGA21	1,573* 1,15-2,52	Non détectée	140,1 89,74-164,69	0,620 0,40-0,77	5,18 3,38-6,54	5,92 2,99-7,69

* statistiquement significatif avec une probabilité F-test de 2.9%

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

La stabilité génétique et phénotypique des événements parentaux Bt11, GA21 et MIR604 a été démontré précédemment. L'événement de transformation MIR162 a été analysé sur trois générations de rétrocroisement par des hybridations de type Southern sans mettre en évidence d'instabilité des transgènes. Le niveau d'expression des protéines de VIP3Aa20 et PMI, est stable après plusieurs générations de maïs dérivés du maïs portant l'événement MIR162.

Les analyses moléculaires décrites précédemment basées sur des hybridations de type Southern ont montré que les transgènes insérés dans le maïs Bt11xMIR604xMIR162xGA21 sont stables. De plus, le programme d'obtention des maïs Bt11xMIR604xMIR162xGA21 comprend un nombre important de croisements, rétrocroisements et autofécondations qui n'ont pas altéré l'intégrité des transgènes dans le produit final.

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

(7.1) Une analyse de composition chimique a été réalisée pour les maïs portant les événements de transformation Bt11, GA21 ou MIR604. L'équivalence de composition de ces maïs avec leurs témoins respectifs non transgéniques a été établie (cf avis du 02/12/05 saisine 2005-SA-0307, avis du 15 juin 2006 saisine 2006-SA-0131, avis du 3 juin 2008 saisine 2008-SA-0092).

Trois analyses de composition chimique sont présentées dans le présent dossier. L'une consiste à comparer la composition des maïs portant l'événement de transformation MIR162 à celle de son témoin (hybride non transgénique quasi-isogénique). L'autre a pour objectif de comparer la composition des maïs hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21 à celle de son témoin (hybride non transgénique quasi-isogénique). La troisième étude vise à comparer la composition des maïs hybrides Bt11xMIR162xGA21 à celle de son témoin (hybride non transgénique quasi-isogénique). Cette dernière ne sera pas décrite dans l'avis mais dans l'avis 2009-SA-0198.

Analyse comparative de composition chimique des maïs MIR162

La composition chimique des hybrides MIR162 (test) obtenus par croisement de deux lignées dont l'une porte l'événement MIR162 a été comparée à celle des hybrides (témoin) obtenus par croisement des deux mêmes lignées non transgéniques. Les plantes ont été cultivées conjointement en champs sur 6 sites aux Etats-Unis en 2005 (3 répétitions par site) et traitées par des pesticides conventionnels.

L'analyse a porté sur le fourrage (7 paramètres proximaux et 2 minéraux) et sur le grain pour un ensemble de paramètres dont notamment, 9 paramètres proximaux, 10 minéraux, 7 vitamines, 18 acides aminés, 5 acides gras (les plus courants), 7 métabolites secondaires et facteurs antinutritionnels potentiels (acide férulique, acide paracoumarique, inositol, acide phytique, inhibiteur trypsique, furfural, raffinose). Les composés analysés correspondent aux recommandations de l'OCDE³.

Les données de chaque paramètre (dont 56 composés du grain) ont subi une analyse statistique (analyse de variance) tous sites confondus et site par site pour comparer les hybrides tests aux hybrides contrôles. Les résultats montrent des différences statistiquement significatives pour certains composés (p -value<0,05). Cependant ces variations sont faibles et les moyennes observées restent dans la gamme des valeurs de composition naturelle du fourrage et des grains de maïs (ILSI et OCDE³).

Analyse comparative de composition chimique des maïs Bt11xMIR162xMIR604xGA21

La composition chimique des hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (test) obtenus par croisement de deux lignées portant chacune deux événements de transformation a été comparée à celle des hybrides (témoin) obtenus par croisement des deux mêmes lignées non transgéniques. Les plantes ont été cultivées conjointement en champs sur 6 sites aux Etats-Unis en 2006 (3 répétitions par site).

L'analyse de composition a porté sur les mêmes 9 paramètres fourragers et les 56 composés du grain décrits ci-dessus (composition de MIR162).

Les données de chaque paramètre ont subi une analyse statistique (analyse de variance) tous sites confondus et site par site pour comparer les hybrides tests aux hybrides contrôles. Les résultats montrent des différences statistiquement significatives pour certains composés (p -value<0,05). Cependant, excepté pour la vitamine B2 et E, ces variations sont faibles et les moyennes observées restent dans la gamme des valeurs de composition naturelle du fourrage et des grains de maïs (ILSI et OCDE). Dans certaines plantes transgéniques et témoins, la concentration moyenne de la vitamine B2 est légèrement plus élevée (maximum +13%) et la concentration en vitamine E est faible.

(7.6) Effet du procédé de traitement

Les procédés de traitement sont ceux usuellement utilisés chez le maïs. La rapide inactivation à 65°C des protéines VIP3Aa20 et PMI permet de conclure que leur présence n'interférera pas avec les processus de transformation.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Ces maïs sont destinés à être utilisés comme les maïs conventionnels pour tous modes de consommation chez l'homme et l'animal.

Des données précises de consommation en Europe ont été fournies. Ces données associées aux quantités mesurées des protéines recombinantes dans le grain permettent de calculer l'exposition pour l'homme.

³ **OECD 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 safety of novel foods and feeds*, ENV/JM/MONO (2002)25.

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

(7.8) Toxicologie**Sécurité des organismes donneurs et des protéines exprimées**

La sécurité sanitaire des organismes donneurs et des protéines exprimées dans les maïs Bt11, MIR604 et GA21 a été évaluée lors de l'examen de la demande de mise sur le marché des maïs portant un événement de transformation unique.

L'interrogation des bases de données contenant les toxines ou les allergènes connus a été reconduite récemment (juin 2009) et a permis de vérifier que les séquences des protéines Cry1Ab, PAT, PMI, mEPSPS, mCry3A ne partagent aucune homologie avec ces protéines.

La sécurité des organismes donneurs et des protéines exprimées dans les maïs MIR162 est basée sur les éléments suivants :

- Les organismes (*Bacillus thuringiensis*, *E. Coli* et *Zea maize*) donneurs des gènes sont largement répandus dans l'environnement de l'homme et des animaux et ne sont pas connus pour avoir des effets délétères pour la santé.
- Les protéines VIP3Aa20 et PMI ont fait l'objet d'une recherche d'homologie de leurs séquences avec des protéines connues pour leur propriété toxique, immunotoxique ou leur activité biologique ou pharmacologique chez l'homme, aucune de ces homologies n'a été identifiées
- Une étude de toxicité aiguë par voie orale (administration unique) a été réalisée chez la souris avec la protéine VIP3Aa20, synthétisée par *E. coli*⁴, à la dose de 1250 mg/kg p.c. Après 14 jours aucune anomalie traduisant un effet toxique sur l'ensemble des paramètres étudiés n'a été observée.
- Une étude de toxicité aiguë par voie orale a été réalisée chez la souris avec la protéine PMI (telle qu'exprimée dans MIR162), synthétisée par *E. coli*⁴, à la dose de 2072 mg/kg p.c. Aucun signe de toxicité n'a été observé.
- L'hybride Bt11xMIR162xMIR604xGA21 exprime 2 types de protéines PMI pour lesquelles les doses non létales sont respectivement de 2072 mg/kg pour MIR 604 PMI et de 3030 mg/kg pour PMI.
- En milieu gastrique simulé (en présence de pepsine), la protéine PMI (telle qu'exprimée dans MIR162) est immédiatement dégradée, la dégradation de la protéine VIP3Aa20 est plus lente toutefois elle est dégradée après 2 minutes d'incubation.

(7.8.4) Étude de toxicité sub-chronique

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été réalisée sur 4 groupes de 12 rats Wistar selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales et aux Bonnes Pratiques de Laboratoire. Le régime comportait deux doses de maïs MIR162 (10 et 41.5%) incorporé à la nourriture, et les animaux ayant reçu du maïs MIR162 ont été comparés à ceux ayant reçu du maïs quasi-isogénique non transgénique.

Les caractéristiques de chacun des aliments ont été définies et la composition des grains analysée. Les protéines VIP3Aa20 et PMI ont notamment été dosées dans le maïs MIR162 (41.47 µg/g et 0.98 µg/g respectivement) et leurs taux ont été calculés dans les régimes (10.68 µg/g et 1.48 µg/g pour VIP3Aa20 à 41.5% et 10% ; 0.31 µg/g pour PMI à 41.5% et en dessous du seuil de détection pour la dose de 10%).

Les tests statistiques mis en œuvre sont clairement précisés. Les paramètres observés sont le poids, la consommation, les observations cliniques, l'évaluation ophtalmologique, le comportement, la pathologie clinique (hématologie, biochimie sanguine), macro et microscopie des organes en fin d'expérience. Quelques variations ont été révélées par l'analyse statistique, toutefois celle-ci s'avère sans signification biologique compte tenu de leur caractère aléatoire. L'analyse globale des résultats ne met pas en évidence d'effet néfaste qui pourrait être imputable au régime contenant du maïs MIR162.

Le type de traitement herbicide des maïs MIR162 et témoins quasi-isogénique ayant été utilisés pour cette étude n'est pas précisé.

⁴ L'équivalence fonctionnelle et biochimique entre les protéines Vip3Aa20 et PMI synthétisées par *E. coli* et celles extraites de maïs MIR162 a été démontrée (même poids moléculaire, même immunoréactivité, absence de glycosylation, même séquence N-terminale).

Considérant que :

- les données toxicologiques des maïs portant l'événement de transformation Bt11, MIR604, GA21 ont été analysées lors de l'examen des lignées parentales et dans le présent dossier pour les maïs portant l'événement MIR162;
- les mécanismes d'action des six protéines Cry1Ab, PAT, mCry3A, VIP3Aa20, PMI et mEPSPS font 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 les maïs comportant les 4 événements de transformation et les lignées parentales comportant chacune un événement ;

il n'apparaît pas nécessaire de disposer d'une étude toxicologique spécifique de l'hybride portant les 4 événements de transformation.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité potentielle repose sur un faisceau d'éléments qui ont été analysés lors de l'examen du dossier de mise sur le marché des événements Bt11, MIR604 et GA21. Cette analyse avait permis de conclure que l'existence d'un caractère allergène pour ces maïs ne pouvait être suspectée.

Evaluation de l'allergénicité de l'événement MIR162

La protéine VIP3Aa20 a été initialement isolée de *Bacillus thuringiensis*, souche AB88, qui n'a aucun historique d'allergénicité. Quant à la protéine PMI, elle est répandue dans l'environnement et est exprimée dans *Escherichia coli* qui n'a pas d'historique d'allergénicité. Une recherche bio-informatique a été conduite afin d'identifier des homologues de séquence avec des protéines allergisantes répertoriées dans les bases de données (FARRP Allergen Database 2009). La recherche a porté à la fois sur les homologues de séquence de plus de 80 acides aminés puis sur 8 acides aminés contigus. Aucune homologie n'est identifiée pour la protéine VIP3Aa20, alors qu'il existe une homologie de séquence pour 8 acides aminés contigus de la protéine PMI avec un allergène connu (α -parvalbumine de *Rana* species CH2001). Des investigations complémentaires ont été conduites afin de rechercher une éventuelle réaction croisée entre la protéine PMI et les IgE spécifiques de sérum de sujets allergiques à la protéine α -parvalbumine. Aucun épitope n'a été reconnu à partir des sérums des sujets allergiques.

La teneur des différentes protéines dans les graines de l'hybride a été mesurée, elle ne diffère pas de la quantité mesurée chez les parents, excepté pour la protéine PMI dont la concentration est environ deux fois supérieure. Elle reste toutefois très faible (3,4 à 6,6 μ g/g de poids sec).

En conclusion et au regard des éléments ci dessus, l'existence d'un potentiel allergénique des maïs hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ne peut être suspectée.

Il convient de noter que ces données 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

Deux études d'alimentarité chez l'animal cible (poulet) sont présentées dans le dossier : une a été réalisée à partir des maïs MIR162 et l'autre à partir des maïs hybrides Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Les études ont chacune mis en œuvre 540 poulets (270 mâles et 270 femelles, 15 répétitions par traitement) nourris pendant 44 jours ou 49 jours avec trois régimes [correspondant aux périodes de démarrage, de croissance et de finition] contenant de 51 à 64 % de maïs transgénique (MIR162 ou Bt11xMIR162xMIR604xGA21). Les animaux sont comparés avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin quasi-isogénique non transgénique ou avec une variété commerciale de maïs (NC2006 ou NC2005).

Les grains de maïs proviennent de plantes cultivées conjointement. Ils ont fait l'objet d'une analyse de composition soit de 5 paramètres proximaux (humidité, protéine, lipides, fibres et

cendres), de 13 acides aminés et de 6 mycotoxines⁵. A la fin des études, les concentrations en protéines nouvellement exprimées (VIP3Aa20 et PMI pour MIR162 et Cry1Ab, PAT, VIP3Aa20, PMI et mCry3A et mEPSPS pour Bt11xMIR162xMIR604xGA21) ont été mesurées dans les grains et dans les différents régimes.

Les observations ont porté sur la croissance, sur le taux de conversion « alimentaire » FCR, sur le taux de survie (>97%) et sur 7 paramètres de carcasse. Les résultats après analyses statistiques ne montrent aucune différence pour l'ensemble des paramètres décrits ci dessus entre les animaux ayant reçu le maïs transgénique (MIR162 et Bt11xMIR162xMIR604xGA21) et les animaux ayant reçu le maïs témoin ou la variété commerciale.

Sur la base des résultats de ces deux études, on peut conclure que les maïs MIR162 et Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ne présentent pas de différences nutritionnelles avec leurs témoins respectifs, de même fonds génétique mais non transgéniques.

Des études sur animaux cibles visant à démontrer l'équivalence nutritionnelle des maïs transgéniques avec leurs témoins ont été également réalisées à partir des maïs portant l'événement GA21, MIR604 et Bt11 et à partir des hybrides portant 2 événements (Bt11xGA21, MIR604XGA21, Bt11XMIR604 et Bt11XMIR604XGA21). Ces études ont été évaluées lors des demandes de mise sur le marché et ont permis de conclure que les maïs transgéniques ne présentent pas de différence nutritionnelle avec leurs témoins.

Conclusions du CES Biotechnologie

Les maïs hybrides Bt11XMIR162XMIR604XGA21 ont été obtenus par croisement conventionnel à partir des parents portant l'événement de transformation Bt11, MIR604, GA21 et MIR162. Les trois premiers événements ont fait l'objet d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché qui a été évalués positivement par l'AFSSA et l'AESA. Les maïs Bt11 et GA21 sont autorisés sur le marché européen.

Les maïs portant l'événement de transformation MIR162 n'ont jamais fait l'objet d'une telle demande. Le présent dossier comprend des données sur la caractérisation moléculaire de l'événement, sur une analyse comparative de composition chimique, une étude nutritionnelle et une analyse toxicologique. Les données toxicologiques comprennent une étude de toxicité aiguë avec les protéines VIP3Aa20 et PMI et une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours effectuée chez le rat par administration orale des maïs MIR162. Dans ces conditions, l'AFSSA considère que l'évaluation de la sécurité des maïs MIR162 est complète. L'évaluation de l'ensemble de ces données permet de conclure que les grains issus des maïs MIR162 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que leurs grains témoins.

Le dossier comprend également des études réalisées spécifiquement à partir des hybrides Bt11XMIR162XMIR604XGA21, objet de la demande d'autorisation de mise sur le marché et répond ainsi aux exigences des lignes directrices européennes.

L'analyse de l'ensemble des données disponibles permet de conclure que les grains de maïs comportant les 4 événements Bt11, MIR604, GA21 et MIR162 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que leurs grains témoins.

⁵ Non détectées dans les grains provenant des maïs MIR162 et contrôles, dans les grains de maïs NC2005 de l'étude MIR162 aflatoxine= 8.5 µg/kg fumonisine =4.5 µg/kg et zéaralenone = 113 µg/kg

Conclusion générale de l'AFSSA

Telles sont les conclusions scientifiques de l'évaluation du CES Biotechnologie. L'AFSSA souligne, néanmoins que cet avis a été rendu sur la base du dossier initial disponible dans les délais prévus. Sachant que l'AESA a déjà demandé des éléments complémentaires au pétitionnaire, cet avis ne préjuge pas des conclusions qui pourraient être rendues ultérieurement sur d'éventuelles études ou données complémentaires versées au dossier avant le terme de l'évaluation en cours par l'AESA.

**Le Directeur Général
Marc MORTUREUX**

Mots clés : OGM, hybride, maïs Bt11, maïs GA21, maïs MIR604, maïs MIR162, tolérance au glufosinate, tolérance au glyphosate, résistance lépidoptère, résistance aux chrysomèles, Phospho-mannose isomérase.