

Maisons-Alfort, le 3 juin 2008

AVIS

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

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie le 9 avril 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié Bt11, résistant à des lépidoptères et tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'importation, la transformation de grains ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (EFSA-GMO-RX-Bt11).

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 22 mai 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

(A) Information générale

Les variétés de maïs **Bt11** portent 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.

Les variétés de maïs portant l'événement Bt11 ont déjà été évaluées par le comité scientifique des plantes (SCP) et autorisées par la communauté européenne en 1998 pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation animale au titre de la directive 90/220/CEE. L'importation de variété de maïs doux Bt11 pour la consommation humaine a été autorisée par la commission le 19 mai 2004 (2004/657/EC, JOCE L131/28).

La présente demande vise à renouveler l'ensemble des autorisations existantes qui sont arrivées à échéance après 10 ans selon les articles 8 et 20 du règlement communautaire N°1829/2003. La demande inclut l'importation des produits pour l'alimentation humaine et animale contenant, consistant ou dérivés de maïs (lignées ou hybrides) génétiquement modifié contenant l'événement Bt11 (incluant les variétés de maïs doux). Le dossier de demande d'autorisation de l'hybride Bt11 x GA21 contenant l'événement de transformation Bt11 a été récemment examiné par l'AFSSA (avis du 15 mai 2008).

(C) Informations relatives à la modification génétique

L'événement Bt11 résulte de la régénération de la plante entière à partir des protoplastes transformés (lignée H8540). 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 cassette permettant l'expression du gène *pat*. Il comprend aussi l'origine de répllication du plasmide bactérien.

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

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Les variétés de maïs portant l'événement Bt11 expriment les deux caractères suivants :
 - une protéine tronquée Cry1Ab comportant 615 acides aminés, 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.
- (2) Les analyses moléculaires de type Southern, amplification par PCR et séquençage révèlent une insertion unique et non remaniée du grand fragment NotI de 6,2 kb issu du vecteur, incluant les 2 cassettes d'expression décrites ci dessus, 1,1 kb du vecteur comprenant les 674 pb de l'origine de répllication plasmidique. Aucun autre ADN d'origine plasmidique ne sont présents dans le génome du maïs Bt11 transformé.

Le séquençage de 350 pb en 5' et de 540 pb en 3' de l'insert montre que l'événement de transformation Bt11 a eu lieu sur le chromosome 8 du maïs au sein d'une série de répétitions en tandem de motifs de 180 pb décrits comme appartenant à de l'hétérochromatine (région silencieuse du génome) où il n'y a pas de gène actif. L'insertion ne peut donc avoir interrompu de gène fonctionnel.

De nombreuses variétés de maïs portant l'événement Bt11 sont cultivées depuis plusieurs années aux Etats-Unis. La séquence de l'insert (7094 pb) a récemment été établie à partir d'ADN d'un maïs doux hybride GH0928 et comparée à la séquence initiale. Huit différences ponctuelles ont été mises en évidence. Aucune ne se situe dans les séquences promotrices, introniques et codantes.

- (3) **Informations relatives à l'expression des produits de gène**
 Les teneurs de la protéine Cry1Ab ont été mesurées par ELISA dans de nombreux tissus à différents stades de développement de la plante à partir d'une variété maïs grain et de 3 variétés de maïs doux.
 La concentration diminue au cours de la maturation et de la sénescence, le maximum étant exprimée dans les jeunes feuilles (154 µg/g de poids sec). Dans le pollen la concentration en protéine Cry1Ab est inférieure à la limite de détection (0,156 µg/g de poids sec). Selon le degré de maturité des plantes, les teneurs mesurées varient, les gammes de variation sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme de concentrations moyennes mesurées en protéine Cry1A dans les variétés de maïs portant l'événement Bt11 variable selon le stade de développement du maïs.

	Tissu	µg/g poids sec
CRYIAb	Feuille	12-154
	Racine	9-22
	Plante entière	6-70
	Grains	2

La protéine Cry1Ab n'a pas été détectée dans les grains des variétés de maïs doux destinés à l'alimentation humaine après appertisation.

Les teneurs de la protéine PAT ont été mesurées par ELISA, elles sont de l'ordre des ng/g dans les feuilles, soies et panicules. L'expression est inférieure à la limite de détection dans les épis, le pollen, les racines et la tige. La protéine PAT représente moins de 0,00016 % des protéines totales du grain.

(5) Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de son expression

La stabilité génétique de l'insert a été vérifiée lors de programme de sélection par backcross. Ainsi la lignée portant l'événement Bt11 a été croisée avec une lignée élite H8540, les lignées BC3 et BC6 résultantes après 3 et 6 générations de backcross (BC3 et BC6) ont été analysées par Southern. Aucune différence au niveau du profil du Southern n'a été détectée démontrant la stabilité de l'insert.

Des données de ségrégation des caractères de résistance au glufosinate d'ammonium et à la pyrale du maïs ont été analysées sur la descendance et les résultats montrent la dominance des caractères et une transmission suivant la loi de ségrégation mendélienne.

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

- (7.1.3) Plusieurs études visant à comparer la composition chimique des variétés de maïs (incluant les variétés de maïs doux) portant l'événement Bt11 à celle de ses témoins (hybrides non transgénique ou lignées isogéniques) ont été réalisées et sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Description des différents essais et paramètres mesurés dans les études de comparaison de la composition chimique des maïs portant l'événement Bt11 par rapport à celle de ses témoins.

Site/Année	Variétés GM, témoins	Paramètres ou composés analysés
France 1995	Lignées et hybrides GM (1) (germplasme européen) Lignées isogéniques et hybrides non GM	Eau, azote, cendres, amidon, cellulose, xanthophylle, 17 acides aminés, 8 acides gras
USA 1995	2 hybrides GM 2 hybrides non GM (2)	Amidon, protéines, lipides, fibres, 18 acides aminés, 5 acides gras
USA 1995	2 hybrides GM 2 hybrides non GM (2)	Cu, Zn, Mg, Mn, acide folique, niacine, vitamine B1 et B2
USA 1996	3 hybrides de maïs doux GM 3 hybrides de maïs doux non GM (2)	Eau, protéine, lipides, cendres, hydrates de carbones, fibres, vitamine A et C, Ca, Na, K et Fe
USA 1998	3 hybrides de maïs doux GM 3 hybrides de maïs doux non GM (1)	5 métabolites secondaires : furfural, acide paracoumarique et férulique, myoinositol, raffinose
France 1998	3 hybrides GM 3 hybrides non GM (2) Traitement au glufosinate d'ammonium	Protéines, lipides, fibres, énergie calculée, hydrates de carbones, 6 acides aminés, 5 acides gras

(1) Génétiquement modifié

(2) chaque hybride est comparé avec son témoin isogénique lui correspondant et non GM

Après analyse statistique des données, les résultats de l'ensemble de ces 5 études ne mettent pas en évidence de différence significative de teneurs des paramètres et des

composés mesurés dans les grains de maïs portant l'événement Bt11 et dans les grains de maïs isogéniques non transformés.

De plus, l'équivalence en substance de la plante entière de variétés de maïs Bt11 avec son témoin isogénique non transformé a été également démontrée lors des études visant à démontrer l'équivalence nutritionnelle des variétés portant l'événement maïs Bt11 dans des expérimentations effectuées sur les bovins (Brake *et al.*, 2003 ; Folmer *et al.*, 2002). Enfin, l'équivalence en substance a été démontrée dans les doubles ou triples transformants porteurs de l'événement Bt11 tels que le triple transformant Bt11xGA21xMIR604 (cf. avis de l'AFSSA du 15 mai 2008).

(7.8) **Toxicologie**

Evaluation de la sécurité des protéines Cry1Ab et PAT

Considérant les éléments suivants :

- les protéines proviennent d'espèces considérées comme sûres et ne présentant pas de potentiel pathogène : *Bacillus thuringiensis* et *Streptomyces viridochromogenes* sont des bactéries du sol et sont présentes à l'état naturel dans l'environnement de l'homme, y compris dans son alimentation
- les protéines Cry1Ab et PAT ne présentent pas d'homologie de structure primaire avec des toxines connues (autres que les δ -endotoxines pour Cry1Ab),
- la digestibilité rapide des protéines par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) soit 90% de protéine Cry1Ab dégradé dans les 2 minutes et une dégradation immédiate de PAT à la concentration habituelle de pepsine.

Une étude de toxicité aiguë chez la souris par voie orale réalisée avec le domaine toxique de la protéine Cry1Ab (pureté 92%), produite par *E. coli*, montre qu'à la dose de 4000 mg/kg p.c./ jour, on n'observe aucun effet délétère sur les souris testées.

Une étude de toxicologie aiguë par voie orale chez la souris (5 males, 5 femelles) à partir de la protéine produite PAT (pureté 51%), produite par *E. coli* a conduit à observer une dose sans effet toxique de 5050 mg/kg p.c.

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 et que ces plantes GM bénéficient à présent d'un historique de consommation par l'homme et l'animal.

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

Aucune étude de toxicité subchronique de 90 jours chez le rat avec l'aliment n'a été réalisée.

Les résultats d'études publiées dans la littérature scientifique internationale (Brake *et al.*, 2003 ; Folmer *et al.*, 2002 ; Shimada *et al.*, 2006) réalisées chez les espèces cibles (poulets, bouvillons, vaches), ne montrent aucune toxicité ou différence d'alimentarité entre les maïs portant l'événement Bt11 et leurs témoins.

(7.9) **Allergénicité**

L'évaluation de l'allergénicité des protéines Cry1Ab et PAT repose sur les éléments suivants :

- ✓ les organismes donneurs des protéines ne sont pas connus pour être à l'origine d'allergène
- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés des protéines Cry1Ab et PAT (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 Cry1Ab et PAT sont sensibles à la protéolyse par la pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) ;
- ✓ l'absence de N-glycosylation de ces protéines ;
- ✓ la faible teneur en protéine Cry1Ab et PAT dans les grains de maïs.

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**

Cinq études d'équivalence nutritionnelle chez les animaux cibles ont été menées dont les caractéristiques principales sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Description des études d'évaluation nutritionnelle chez les animaux cibles du maïs portant l'événement Bt11.

Animal cible (publication)	durée (jours)	Traitement	Effectif, % dans la ration	Paramètres observés
Poule pondeuse (1)	14	Bt11, Bt176, témoins non GM	4 groupes de 10 64%	5 paramètres zootechnique, teneur en protéine Cry et PAT dans 5 tissus (jaune et blanc d'œufs, foie, muscle pectoral et cuisse)
Poulet en croissance (Brake <i>et al.</i> , 2003)	42	Bt11, Bt11 traité (2), témoin isogénique non GM	200 males, 200 femelles par traitement, 48%(démarrage) 56%(croissance) 63% (finition)	6 paramètres zootechniques, 5 paramètres de la consommation d'aliment, 5 paramètres de survie, 8 paramètres de rendement à l'abattage et de découpe
Vache laitière	14	Bt11, Bt176 témoin isogénique	12, 37,5 à 41,7 kg de fourrage par vache et par jour	teneur en protéines Cry et Pat dans la ration et dans le lait, production et composition du lait, conversion, composés du lait, paramètres zootechniques
Vache laitière (Folmer <i>et al.</i> , 2002)	21	Bt11, témoin isogénique	16 (4 répétitions), 2 traitements, 40% maïs fourrage	production du lait, paramètres de digestion
Bouvillon en croissance (Folmer <i>et al.</i> , 2002)	70	Bt11, témoin isogénique	67, pâturage	performance et préférence de pâturage
Bouvillon en croissance (Folmer <i>et al.</i> , 2002)	101	Bt11, témoin isogénique	128, 90% maïs fourrage	5 performances zootechniques
Bouvillon (Shimada <i>et al.</i> , 2006)	101	Bt11, témoin isogénique	12 (6 / traitement), 43,3% de grains	données biochimiques et hématologiques, 7 paramètres de digestion

- (1) cette expérience avait été critiquée par l'AFSSA en 2004 en raison d'un mélange des grains, le régime témoin contenant par inadvertance une proportion de grains Bt11.
 (2) maïs traité au glufosinate d'ammonium

L'ensemble des résultats des études résumées dans le tableau 4 permet de conclure à l'équivalence nutritionnelle du grain et du fourrage des variétés de maïs portant l'événement Bt11 avec son témoin isogénique non GM. La durée de certaines de ces expériences associée à la proportion massive d'incorporation des produits issus d'OGM dans la ration permet de conforter les études visant à montrer l'absence de toxicité pour l'homme et l'animal. On notera une absence des protéines Cry1Ab et Pat

dans la viande, le lait et les œufs des animaux nourris à base de maïs portant l'événement Bt11.
L'équivalence nutritionnelle entre le double transformant Bt11xGA21 et son témoin isogénique avait été établie (Avis de l'AFSSA du 15 mai 2008).

Malgré une présentation confuse des données dans le dossier technique, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments considère que :

- la structure moléculaire des maïs portant l'événement de transformation Bt11 est caractérisée
- l'analyse de composition chimique conduite sur plusieurs études ne met pas en évidence de différence significative et démontre l'équivalence en substance des variétés de maïs Bt11 par rapport aux variétés de maïs témoin et conventionnelles,
- bien qu'il n'y ait pas d'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rongeur à partir d'une variété de maïs portant l'événement Bt11, l'historique de consommation de ces variétés de 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, conduisent à considérer que la consommation humaine et animale de variétés de maïs portant l'événement Bt11 ne présentent pas de risques,
- les études d'équivalence nutritionnelle réalisée chez les animaux cibles (poule pondeuse, poulet, vache laitière et bouvillon) ne mettent pas en évidence de différences nutritionnelles entre les maïs Bt11 et les maïs témoins,

En conséquence, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments estime, qu'au regard des données présentées dans le dossier les variétés de maïs portant l'événement de transformation Bt11 et leurs produits dérivés présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les variétés de maïs conventionnelles et leurs produits dérivés.

Mots clés : OGM, maïs Bt11, renouvellement, résistance aux lépidoptères, tolérance au glufosinate d'ammonium, PAT, Cry1Ab

La Directrice Générale

Pascale BRIAND

Références bibliographiques

Brake, J. , Faust, M.A., Stein, J. 2003. Evaluation of Transgenic Event Bt11 Hybrid Corn in Broiler Chickens. *Poult Sci.* 82:55.

Folmer, J.D., Grant, R.J., Milton, C.T., Beck, J. 2002. Utilization of Bt corn residues by grazing beef steers and Bt corn silage and grain by growing beef cattle and lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80:1352.

Shimada, N., Murata, H., Mikami, O., Yoshioka, M., Guruge, K.S., Yamanaka, N., Nakajima, Y. , Miyasaki, S. 2006. Effect of feeding calves genetically modified corn Bt11: a clinico-biochemical study *J.Vet. Med. Sci.* 68:1115.