

Maisons-Alfort, le 10 juin 2008

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à une demande de mise sur le marché d'un maïs hybride  
génétiquement modifié Bt11xMIR604, résistant aux insectes  
(lépidoptères et chrysomèles des racines) et tolérant au glufosinate  
d'ammonium, pour l'importation et la transformation de cet OGM 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 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 de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié Bt11xMIR604, résistant aux insectes (lépidoptères et chrysomèles des racines) et tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de 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 (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 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**

Cette demande de mise sur le marché concerne le maïs Bt11xMIR604, 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 **MIR604** portant le gène codant une protéine Cry3A, toxique pour les coléoptères comme *Diabrotica* et le gène marqueur codant une phospho-mannose isomérase conférant aux cellules de la plante génétiquement modifiée l'aptitude à cataboliser le mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.

### Historique des autorisations de mise sur le marché de Bt11

Les maïs portant l'événement Bt11 ont été évalués par le comité scientifique des plantes (SCP) et autorisés 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 variétés de maïs doux Bt11 pour la consommation humaine a été autorisée par la commission le 19 mai 2004 (2004/657/EC, JOCE L131/28). Un avis favorable relatif au renouvellement de l'autorisation (après 10 ans) de mise sur le marché des variétés de maïs Bt11 pour l'importation, la transformation des grains et leur utilisation en alimentation humaine et animale selon les articles 8 et 20 du règlement communautaire n°1829/2003 a été rendu le 3 juin 2008.

Historique des autorisations 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 déposé 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 en 2005 qui a rendu un avis favorable (avis du 2 décembre 2005).

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

- de la lignée parentale portant l'événement de transformation Bt11,
- de la lignée parentale portant l'événement de transformation MIR604.

Certains points de l'évaluation ne seront pas repris car ils figurent dans les avis relatifs à la demande d'autorisation de mise sur le marché des lignées parentales (avis du 2 décembre 2005 et avis du 3 juin 2008).

**(C) Informations relatives à la modification génétique**

Considérant que le maïs Bt11xMIR604 a été obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifié Bt11 et MIR604 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.

La description des événements Bt11 et MIR604 est détaillée dans les avis du 3 juin 2008 et du 2 décembre 2005.

**(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée**

(1) Les maïs hybrides Bt11xMIR604 expriment les quatre protéines suivantes :

- la 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 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*, responsables de la chrysomèle des racines.
- la phospho-mannose isomérase (PMI) issue du colibacille *pml*, enzyme catalysant l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate et permettant la sélection des plantes transformées sur milieu contenant uniquement du mannose comme source de carbone ;

(2) Considérant que les analyses de type Southern, utilisant des sondes spécifiques des inserts Bt11 et MIR604, montrent que les inserts présents chez les maïs hybrides Bt11xMIR604 correspondent bien à ceux hérités de chacun des parents, que la structure moléculaire des inserts décrite chez les parents est préservée chez les hybrides et que les inserts sont présents en une seule copie dans le génome nucléaire des hybrides.

Considérant que l'analyse des régions flanquant les insertions avait été réalisée chez les lignées parentales Bt11 et MIR604 (cf. avis du 3 juin 2008 et du 2 décembre 2005) ;

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

Les niveaux en protéines Cry1Ab, PAT, Cry3A et PMI 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 maïs portant l'événement Bt11, portant l'événement MIR604 et des hybrides Bt11xMIR604 portant les 2 événements. Ces maïs ont été cultivés conjointement aux États-Unis en 2005 (4 essais).

Considérant que les valeurs maximales sont mesurées dans les feuilles jeunes pour Cry1Ab (26 µg/g de poids sec), dans les feuilles à maturité pour Cry3A (42 µg/g de poids sec), dans les feuilles jeunes pour PMI (10 µg/g de poids sec) ; que les valeurs correspondant à la protéine PAT sont très faibles (0.2 µg/g de poids sec) dans tous les tissus.

Une analyse de variance des données visant à comparer le niveau d'expression des protéines recombinantes dans l'hybride et dans la lignée parentale, a mis en évidence un niveau d'expression plus important de protéine Cry1Ab dans les feuilles de l'hybride Bt11xMIR604 au stade floraison. Cependant, cette différence ne se retrouve pas à d'autres stades de développement.

Considérant les teneurs moyennes mesurées dans les grains sont les suivantes :

**Tableau 1** : Teneurs moyennes en protéines Cry1Ab, PAT, Cry3A et PMI mesurées dans les grains de maïs Bt11, de maïs MIR604 et de maïs hybride Bt11xMIR604.

Protéine	Evènement	Teneur en µg/g de poids sec (étendue des valeurs)
<b>Cry1Ab</b>	Bt11	1,45 (1, 39-1,56)
	Bt11 x MIR604	1,74 (1, 44-1,93)
<b>PAT</b>	Bt11	<0.04
	Bt11 x MIR604	<0.04
<b>Cry3A</b>	MIR604	0,68 (0,61-0,78)
	Bt11 x MIR604	0,66 (0,55-0,83)
<b>MIR604-PMI</b>	MIR604	1,82 (1,58-2,22)
	Bt11 x MIR604	1,85 (1,38-2,72)

(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 Bt11xMIR604 a été vérifiée par Southern, que la stabilité phénotypique de la lignée Bt11 et de la lignée MIR604 ont été vérifiées ;

L'hybride Bt11xMIR604 est produit à partir des lignées Bt11 et MIR604 ; 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) Considérant que les équivalences en substance entre la lignée portant l'évènement Bt11 et son témoin et entre la lignée portant l'évènement MIR604 et son témoin ont été démontrées (cf. avis du 3 juin 2008 et avis du 2 décembre 2005) ;

L'analyse de composition chimique visant à montrer l'équivalence substantielle de l'hybride Bt11xMIR604 a été réalisée sur le maïs comportant 3 événements de transformation « Bt11xMIR604xGA21 » issu du croisement conventionnel de maïs génétiquement modifié comportant en plus des événements Bt11 et MIR604, l'évènement de transformation GA21<sup>1</sup>. Ce choix est en accord avec les lignes directrices de l'AESA<sup>2</sup> 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'évènements dans la mesure où chacun d'eux est contenu dans le multi-transformant utilisé pour l'évaluation.

Par conséquent, l'AFSSA 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.

Considérant que 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 ;

<sup>1</sup> GA21 est génétiquement modifié par introduction d'un gène codant la protéine mEPSPS (5-énol pyruvyl-3-phosphoshikimique acide synthétase) mutée de maïs conférant la tolérance au glyphosate. Les maïs portant cet évènement ont été évalués par l'AFSSA et ont reçu un avis favorable le 15 juin 2006.

<sup>2</sup> 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.

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 OCDE<sup>3</sup>), 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 Bt11xMIR604 et les maïs témoins ;

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) **Evaluation de la sécurité des protéines Cry1Ab, PAT, Cry3A et PIM**

Considérant que la sécurité de ces protéines a déjà été évaluée lors de l'examen de la demande d'autorisation des variétés parentales Bt11 et MIR604 (cf. avis du 3 juin 2008 et avis du 2 décembre 2005) ;

Considérant que les valeurs des doses sans effet toxiques déduites des études de toxicité aiguë sont rappelées dans le tableau 2.

**Tableau 2** : doses sans effet toxique calculées à partir des études de toxicité aiguë des protéines Cry1Ab, PAT, Cry3A et PIM effectuées chez les rongeurs.

	Dose de protéine administrée	Pureté de la protéine
<b>CRY1Ab (1)</b>	4000 mg/kg p.c.	92%
<b>PAT (2)</b>	5050 mg/kg p.c.	51%
<b>CRY3A (3)</b>	2632 mg/kg p.c.	90,30%
<b>MIR604-PMI (3)</b>	5050 mg/kg p.c.	61%

- (1) étude présentée dans le dossier d'autorisation du maïs MON810.
- (2) étude présentée dans dossier de demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché des variétés de maïs portant l'événement Bt11
- (3) étude présentée dans dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché des variétés de maïs portant l'événement MIR604

<sup>3</sup> 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.

(7.8.2) **Etude de la toxicité subchronique****Maïs BT11**

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

Considérant que les résultats des 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 les maïs témoins ;

**Maïs MIR604**

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité sub-chronique a été réalisée durant 90 jours avec des rats des deux sexes en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (10 et 41,5%) du maïs grain MIR 604 en comparaison avec un maïs témoin quasi-isogénique ;

Considérant que les éléments principaux de cette étude sont indiqués dans l'avis de l'AFSSA du 2 décembre 2005 qui avait été conclu au même niveau de sécurité entre les maïs portant l'événement MIR604 et les maïs témoins ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que l'évaluation de l'allergénicité des protéines Cry1Ab, PAT, Cry3A et PIM a été conduite et est présentée dans les dossiers de demande d'autorisation du maïs Bt11 et du maïs MIR604 (cf. avis du 3 juin 2008 et avis du 2 décembre 2005) ;

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Considérant qu'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 50%, 56% et 62% de maïs Bt11xMIR604 en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du maïs témoin (hybride correspondant négatif pour les 2 événements) et une variété commerciale de maïs cultivés conjointement aux USA en 2005 ;

L'équivalence de composition chimique (7 paramètres proximaux, 13 acides aminés) entre les grains provenant du maïs Bt11xMIR604 et ceux provenant des maïs témoins incorporés dans les rations a été vérifiée. Les teneurs en 5 mycotoxines<sup>4</sup> et les dosages des protéines recombinantes ont été déterminés et les résultats sont : Cry1Ab a une teneur de 1,43µg/g de grain, PAT et Cry3A ne sont pas détectables, PMI a une teneur de 0,66µg/g.

Considérant que 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 (maximum 1,86) et sur 7 données de découpe pour les 2 sexes ;

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

- ✓ aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le maïs Bt11x MIR604, le maïs témoin ou la variété commerciale pour ce qui concerne les performances pondérales, l'efficacité alimentaire et 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 ;

Sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du maïs Bt11xMIR604 avec son témoin non génétiquement modifié.

<sup>4</sup> On notera que comme cela a déjà été constaté dans les maïs exprimant des protéines « Bt », les concentrations en fumonisine B1 et en aflatoxine sont plus faibles dans les grains de maïs génétiquement modifiés que dans les grains de maïs témoins.

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

- Les maïs hybrides Bt11xMIR604 sont obtenus par croisement conventionnel des lignées de maïs génétiquement modifiées Bt11 et MIR604. Par conséquent, ils expriment simultanément quatre protéines codées par les deux inserts correspondant aux événements de transformation Bt11 et MIR604. Les protéines PAT et PMI agissent dans des voies métaboliques différentes et les deux protéines Bt (Cry1Ab et Cry3A) se différencient par leur toxicité envers des cibles spécifiques (pyrales et sésamies pour Cry1Ab et chrysomèles des racines pour Cry3A), l'AFSSA estime qu'il n'y a pas d'interactions fonctionnelles connues qui pourraient modifier la sécurité sanitaire des maïs exprimant simultanément les 4 protéines.
- Les études menées pour évaluer l'équivalence de composition ont été réalisées sur les maïs Bt11xMIR604xGA21 comportant 3 événements de transformation et sont considérées comme extrapolables aux maïs hybrides Bt11xMIR604 selon les lignes directrices de l'AESA. 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 prend en compte ces résultats d'autant plus que l'équivalence de composition chimique entre Bt11xMIR604 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 sub-chronique de 90 jours chez le rongeur à partir du maïs portant l'événement de transformation Bt11, 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 conduisent à considérer que la consommation humaine et animale des hybrides Bt11xMIR604 de maïs portant les événements Bt11 et MIR604 ne présentent pas de risque.

En conséquence, l'Agence Française de Sécurité des Aliments considère que les variétés de maïs portant les deux événements de transformation Bt11 et MIR604 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 Bt11, maïs MIR604, résistance aux lépidoptères, tolérance au glufosinate d'ammonium, résistance aux chrysomèles, Phospho-Mannose Isomérase.

**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.