

Maisons-Alfort, le 18 juillet 2003

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à une demande d'avis sur le rapport d'évaluation initiale  
établi par les autorités allemandes concernant la mise sur le marché  
d'un maïs grain génétiquement modifié lignée MON 863 et  
d'un maïs hybride MON 863 x MON 810 résistants aux insectes  
au titre du règlement (CE) 258/97 relatif aux nouveaux aliments et  
aux nouveaux ingrédients alimentaires**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 20 juin 2003 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur le rapport d'évaluation initiale établi par les autorités allemandes concernant la mise sur le marché d'un maïs grain génétiquement modifié lignée MON 863 et d'un maïs hybride MON 863 x MON 810 résistants aux insectes au titre du règlement (CE) 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

La demande porte sur un maïs génétiquement modifié (hybride) porteur de deux résistances à des insectes et obtenu par croisement conventionnel de deux lignées de maïs génétiquement modifiés : MON 863 et MON 810. La lignée MON 810 est déjà autorisée en Europe par décision de la Commission 98/294/CE du 22 avril 1998 et en France par arrêté du 5 août 1998.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 juillet 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire émet l'avis suivant.

### Informations relatives aux deux modifications génétiques et à l'hybride

#### **Événement MON 863**

Considérant que la lignée MON 863 est porteuse du gène *Cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis* codant une protéine "toxique" spécifique des larves de coléoptères, en particulier le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) et également de coléoptères ravageurs des racines de maïs (*Diabrotica sp*) ;

Considérant que :

- la construction, réalisée par biolistique, est constituée d'un gène marqueur *nptII* (néomycine phospho-transférase) codant la protéine NPTII, antagoniste des antibiotiques néomycine, kanamycine, gentamycine A et B, et d'un gène codant la protéine Cry3Bb1,
- il y a une seule insertion et cette insertion contient une seule construction,
- l'intégrité de la construction introduite, évaluée par cartographie de restriction, a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante sur 9 générations successives,
- on ne retrouve pas de séquence correspondant au plasmide dans le génome du maïs MON 863 ;

Considérant que les éléments bordures de l'insertion ont été analysés [508 bp (paires de bases) en 5' amont dont 266 bp du promoteur 35S et 584 bp en 3' aval dont 224 bp de la partie génomique du maïs] et qu'une comparaison des éléments bordures avec des banques de données de séquences publiques semble montrer que l'insertion s'est faite de façon concomitante avec une séquence d'origine mitochondriale codant du côté de l'extrémité 5' pour la sous-unité 4 d'une NADH déshydrogénase ; ceci ne devrait pas induire de perturbations métaboliques majeures en raison de la présence de ce gène dans les mitochondries. Cependant, il aurait été souhaitable de connaître la séquence en 3' au-delà du fragment d'origine mitochondriale co-intégré avec l'insert et correspondant au point d'insertion dans le génome ;

Considérant que la protéine Cry3Bb1 diffère de 7 acides aminés par rapport à la protéine de référence Cry3Bb, lui conférant une plus grande efficacité vis-à-vis des insectes cibles ;

#### **Evénement MON 810**

Considérant que la lignée MON 810 est porteuse du gène tronqué *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* codant une protéine "toxique" spécifique des lépidoptères (*Ostrinia nubilalis*) ;

Considérant que des variétés de maïs génétiquement modifié portant l'événement de transformation MON 810 sont autorisées en Europe et en France depuis 1998 ;

Considérant qu'une comparaison des éléments bordures avec des banques de données de séquences publiques semble montrer que l'insertion s'est faite dans un gène codant une alpha zéine du maïs ; ceci ne devrait pas induire de perturbations métaboliques majeures en raison de la redondance des gènes de zéine dans le génome ;

#### **Hybride MON 863 x MON 810**

Considérant que l'hybride résulte d'un croisement conventionnel des deux lignées de maïs, MON 863 et MON 810, que son génome contient deux inserts différents, l'un correspond aux gènes *nptII* et *Cry3Bb1*, l'autre au gène tronqué *Cry1Ab* et que ce croisement n'a pas altéré la fonctionnalité des inserts ;

#### **Information relative à la présence des protéines Cry3Bb1, Cry1Ab et NPTII dans la plante**

Considérant que le dosage quantitatif des protéines exprimées a été réalisé dans des conditions expérimentales rigoureuses : dans les feuilles, le fourrage ou plante entière, le pollen, les soies, les racines, à plusieurs stades végétatifs (entre 21 et 117-125 jours de post-levée) ;

Considérant que les données analytiques recueillies au cours de deux saisons successives de culture aux USA et en Argentine sont les suivantes (exprimées en µg/g de tissu frais) :

Variété	MON 863	MON 863 x MON 810		MON 810
Protéine exprimée dans le grain	<b>Cry 3Bb1</b>	<b>Cry3Bb1</b>	<b>Cry1Ab</b>	<b>Cry1Ab</b>
Site :				
- USA (1999)	70 (49-86)	- (2)	- (2)	-
- Argentine (1999/2000)	43,7 (LD-84,1)	61,1 (38,5-83,1)	0,84 (0,63-1,2)	0,46 (0,24-0,77)

(1) LD, limite de détection; (2) Valeurs non disponibles

Considérant que les teneurs maximales en protéine Cry3Bb1, exprimées par rapport à la matière fraîche, sont observées dans le grain et le pollen mais qu'elles représentent au maximum 0,0007 % des protéines totales du grain ;

Considérant que les teneurs pour ces deux toxines diminuent régulièrement avec le stade de végétation, en accord avec les données de Fearing<sup>1</sup> *et al.* (1997) pour la teneur en Cry1Ab d'un autre maïs résistant à la pyrale ;

Considérant cependant que la teneur en Cry3Bb1 étant de 50 à 100 fois plus élevée que la teneur en Cry1Ab, que ce soit pour le grain de maïs MON 863 ou pour l'hybride MON 863 x MON 810, afin de confirmer cette différence de teneurs importante, il conviendrait de disposer de l'ensemble des données analytiques obtenues sur le site USA en 1999 ;

Considérant que la teneur en protéine NPT II déterminée sur MON 863 et sur MON 863 x MON 810 est, dans les deux cas, toujours inférieure au seuil de détection de 0,076 µg/g de tissu frais ;

#### **Informations relatives à la composition chimique et à la qualité nutritionnelle du grain**

Considérant que les essais, comportant plusieurs répétitions par site, ont été effectués sur deux sites, en 1999 aux USA et en Argentine en 1999/2000, que les données chiffrées disponibles, analysées statistiquement, pour le grain et le fourrage (humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, ADF<sup>2</sup>, NDF<sup>3</sup>, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, acide phytique et facteurs anti-trypsique, métabolites secondaires : acide férulique, inositol, raffinose et acide p-coumarique) sont comparables à celles figurant dans les tables de composition pour :

- la lignée MON 863 par rapport à un témoin (contrôle) à la fois pour les essais aux USA et en Argentine,
- l'hybride MON 863 x MON 810 par rapport à un témoin pour les essais en Argentine seulement ;

Considérant qu'au regard de ces données, on peut formuler l'hypothèse d'une équivalence nutritionnelle du maïs MON 863 et de l'hybride MON 863 x MON 810 par rapport aux maïs témoins ;

Considérant qu'il n'existe pas de données sur la réduction éventuelle du taux de mycotoxines chez les maïs porteurs des gènes de protection contre les insectes, alors que l'on pourrait en espérer un effet favorable ;

<sup>1</sup> Fearing P.L., Brown D., Vlachos D., Meghin M., Privalle L. (1997). *Molecular breeding*, 3 169-176

<sup>2</sup> ADF : résidu après traitement par un détergent acide

<sup>3</sup> NDF : teneur en paroi cellulaire estimée par le résidu obtenu à la suite d'un traitement contenant un détergent neutre

**Information relative à l'utilisation de maïs portant l'événement de transformation MON 863 et à l'hybride MON 863 x MON 810**

Considérant que le maïs grain destiné à l'alimentation humaine est généralement utilisé après transformation sous forme de produits dérivés (amidon, sirop de glucose/fructose, ...) qui conduit à une diminution très importante de la fraction protéique ;

**Informations relatives à la dégradation enzymatique *in vitro* et au potentiel allergénique des protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPTII**

***Protéines Cry1Ab et NPTII***

Considérant que l'équivalence des protéines NPTII et Cry1Ab synthétisées par *E. coli* et extraites respectivement de MON 863 et MON 810 a été démontrée ;

Considérant que ces deux protéines (synthétisées par *E. coli*) sont rapidement dégradées en 15 secondes à deux minutes en présence d'enzymes protéolytiques en milieu acide, que ce test de dégradation a déjà été validé dans le cas de l'autorisation de l'événement MON 810 ;

Considérant que la comparaison des séquences d'acides aminés des protéines NPTII et Cry1Ab avec les séquences de protéines connues pour être allergènes (respectivement 567 et 219 protéines) ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de ces deux protéines ;

***Protéine Cry3Bb1***

Considérant que l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine Cry3Bb1 synthétisée par *E. coli* et extraite de MON 863 est démontrée ;

Considérant que la protéine Cry3Bb1, extraite de la plante, comporte 653 acides aminés dont la fraction N terminale est acétylée, mais que cette propriété n'a jamais été associée à un risque d'allergénicité, qu'elle présente une forte similitude de séquence aminée avec les protéines delta endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et qu'elle diffère dans sa séquence des toxines ou des protéines à activité pharmacologique connues (comparaison avec 4677 séquences protéiques) ;

Considérant toutefois que :

- la dégradation de la protéine Cry3Bb1 (synthétisée par *E. coli* ou extraite des grains de maïs MON 863) par les enzymes protéolytiques en milieu acide (fluide gastrique) est plus lente (15 minutes) que celle de la protéine Cry1Ab,
- la digestion de la protéine Cry3Bb1 (synthétisée par *E. coli*) dans un système intestinal simulé laisse, au bout de 24 heures, un polypeptide résiduel de 59 KDa qui conserve des propriétés insecticides testées sur des larves d'insectes ;

Considérant que la comparaison de la séquence des acides aminés de la protéine Cry3Bb1 avec 567 séquences de protéines connues pour être allergènes ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, pour

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 ;

#### **Etude de toxicité aiguë des protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPTII**

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë par voie orale chez le rat ou la souris a été réalisée avec chacune des trois protéines Cry1Ab, Cry3Bb1 et NPTII, qu'aucun effet n'a été observé aux doses testées les plus élevées (respectivement 4000, 3200 et 5000 mg/kg p.c.) ;

Considérant qu'à partir de ces doses uniques les plus élevées, des marges de sécurité sont calculées et qu'elles sont très protectrices au regard de l'exposition alimentaire estimée des adultes et des adolescents ; il convient cependant de s'interroger sur la pertinence d'un tel calcul fondé sur une donnée de toxicologie aiguë ;

#### **Etude de tolérance et de toxicité subchronique chez le rat**

##### ***Lignée MON 863***

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain MON 863 en comparaison avec un maïs "isogénique" et 6 autres variétés de maïs ;

##### ***Lignée MON 810***

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours sur des rats des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier l'effet de deux taux d'incorporation (11 et 33 %) du maïs grain MON 810 en comparaison avec un maïs "isogénique" ;

Considérant que, dans les deux études, les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres urinaires et sanguins ont été mesurés au cours de l'étude, qu'au sacrifice à 90 jours, des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique de 8 organes (poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur 18 organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment à base de maïs transgénique ;

##### ***Hybride MON 863 x MON 810***

Considérant que l'hybride MON 863 x MON 810 n'a volontairement pas été testé pendant 90 jours chez le rat, le pétitionnaire estimant que les deux essais de toxicité sub-chronique sur chacun des maïs parents sont suffisants pour démontrer l'innocuité des produits de l'hybride ;

Considérant cependant que l'hybridation pourrait conduire à la modification de l'expression des gènes, y compris ceux codant les deux toxines, ou que la présence conjointe des deux

toxines serait susceptible d'induire des effets toxiques non apparents pour chaque toxine, il conviendrait de s'assurer par une étude de tolérance et de toxicité subchronique chez le rat de l'absence d'effets néfastes et toxiques significatifs chez l'hybride ;

### **Etude de tolérance et d'alimentarité chez le poulet**

#### ***Lignée MON 863***

Considérant qu'une étude a été réalisée sur des poulets en croissance des deux sexes pendant 42 jours, consistant à étudier l'effet d'une alimentation contenant le maïs MON 863, la variété "isogénique" et 5 autres variétés commerciales de maïs non génétiquement modifié en comparant les performances de croissance, d'efficacité et de composition des muscles pectoraux et de la cuisse ;

Considérant qu'aucune différence significative n'ayant été observée entre les résultats obtenus pour le maïs MON 863 et les autres variétés de maïs, on peut donc conclure à l'équivalence alimentaire de la nouvelle plante ;

#### ***Hybride MON 863 x MON 810***

Considérant que l'hybride MON 863 x MON 810 n'a pas été testé chez le poulet ;

Considérant cependant que l'hybridation pourrait conduire à la modification de l'expression des gènes, y compris ceux codant les deux toxines, ou que la présence conjointe des deux toxines serait susceptible d'induire des effets toxiques non apparents pour chaque toxine, il conviendrait de s'assurer par une étude de tolérance et d'alimentarité chez le poulet en croissance de l'absence d'effets néfastes et toxiques significatifs chez l'hybride,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments soutient, en ce qui concerne la présence du gène marqueur *npt II* conférant la résistance à la kanamycine, la position de l'Etat membre rapporteur qui s'en réfère aux travaux entrepris par la Commission européenne<sup>4</sup> sur l'utilisation de gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques dans les organismes génétiquement modifiés et dont les résultats ne sont pas encore connus,

et, compte tenu de cette réserve, elle estime que :

- les données fournies pour évaluer les risques, liés à la consommation de maïs de la lignée génétiquement modifiée MON 863 résistante aux insectes, permettent de considérer que les aliments et ingrédients alimentaires issus de cette lignée présentent la même sécurité sanitaire que les produits issus d'une lignée conventionnelle ;
- la conclusion du pétitionnaire, qui considère l'innocuité de l'hybride MON 863 x MON 810 démontrée par les études sur chacun des parents, ne peut être retenue. Afin de vérifier l'absence d'effets néfastes ou toxiques significatifs de l'hybride, il conviendrait

<sup>4</sup> En vue de la mise en œuvre de l'article 4 de la directive 2001/18/CE, un groupe de travail de la Commission a été chargé d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques qui pourraient présenter un effet néfaste sur la santé humaine et l'environnement, ceux qu'il sera nécessaire d'éliminer et ceux qui feront partie d'une liste négative.

de réaliser une étude de tolérance et toxicité subchronique chez le rat ou une étude d'alimentarité chez le poulet en croissance ;

en l'absence des résultats de cette étude, un avis scientifiquement fondé concernant la sécurité sanitaire des aliments et ingrédients alimentaires issus du maïs hybride MON 863 x MON 810 ne peut être rendu.

**Martin HIRSCH**