

Please find English translation of the report at the end of this text

RAPPORT D'ÉVALUATION

Demande d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié (événement de transformation BT11) résistant aux lépidoptères ravageurs du maïs et tolérant au glufosinate ammonium, déposé par SYNGENTA SEEDS SAS au nom de SYNGENTA SEEDS AG.

1. INTRODUCTION

Conformément à l'article 35 de la directive 2001/18/CE, le demandeur a complété son dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs BT11 par des informations supplémentaires requises par la nouvelle directive, qui concernent notamment les modalités d'identification de détection et de traçabilité de cet OGM, un plan de surveillance et de monitoring et la durée de l'autorisation demandée. A cette occasion le dossier a été actualisé par des informations récentes relatives à l'évaluation du risque de cet OGM.

Le dossier soumis pour la demande d'autorisation de maïs génétiquement modifié de la société **SYNGENTA SEEDS SAS**, a été établi conformément aux informations prescrites par la directive 90/220/CEE. Le dossier et ses annexes contiennent les caractéristiques de l'OGM et les études relatives à l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement.

2. UTILISATION

Cette lignée de maïs génétiquement modifiée est destinée aux mêmes usages que toute autre variété de maïs conventionnelle. La demande d'autorisation concerne la mise en culture sur le territoire européen de cette lignée de maïs génétiquement modifiée et de toute variété issue de reproduction sexuée avec cette lignée. Cette lignée de maïs dispose déjà d'une autorisation communautaire de mise sur le marché au titre de l'importation (décision de la Commission n°98/292/CE). Par ailleurs, les produits destinés à l'alimentation humaine qui en sont issus ont fait l'objet d'une notification dans le cadre du règlement 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients.

3. DESCRIPTION DU PRODUIT

3.1 Méthode de transformation

L'événement de transformation Bt11 a été obtenu en introduisant dans des protoplastes de maïs un mélange d'ADN correspondant à la fraction de grande taille du

plasmide pZO1502 coupé par l'enzyme de restriction *NofI*. Les plantes sont régénérées à partir des cultures des cellules transformées.

3.2 Description moléculaire et génétique

3.2.1 Le plasmide

Le plasmide pZO1502 dérive du plasmide pUC 18 et contient :

- i) une version tronquée du gène *cryIA(b)*, isolé de *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* HDI (Btk), sous le contrôle du promoteur 35S du CamV et des séquences de terminaison 3'*nos*. L'intron IV6 de l'alcool déhydrogenase de maïs 1S a été incorporé pour amplifier l'expression du gène chez les monocotylédones. Le gène conduit à la production dans la plante de la toxine Btk qui protège la plante des dégâts des larves des lépidoptères foreurs de la tige (la pyrale du maïs et la sésamie).
- ii) Le gène *pat*, isolé de la souche Tü494 du micro-organisme du sol *Streptomyces viridochromogenes*, placé sous le contrôle du promoteur 35S du CamV et des séquences de terminaison 3'*nos*. L'intron IV2 de l'alcool dehydrogenase de maïs 1S a été incorporé pour amplifier l'expression du gène chez les monocotylédones.
- iii) Le plasmide pZO1502 contient le gène *AmpR*, qui confère la résistance à l'antibiotique Ampicilline. Le gène a été utilisé comme marqueur pour le maintien et la sélection du plasmide dans les étapes permettant d'amplifier le plasmide chez les bactéries *E. coli*.
- iv) L'ADN du plasmide pUC 18 contient également des portions des gènes *lacZ* et *lacI* et un segment contenant l'origine de réplication procaryote *ori*.

3.2.2 Eléments génétiques introduits dans l'OGM

La plante transgénique ne contient que le gène fusion *pat*, le gène fusion *Btk*, un fragment d'ADN portant l'origine de réplication *ori* ainsi que diverses séquences d'ADN synthétique d'intérêt biotechnologique.

Les analyses de type Southern et PCR montre que les lignées transgéniques, dérivées de la lignée initiale Bt11, ne portent pas le gène *AmpR*. Donc aucun gène de résistance à un antibiotique n'est présent dans l'événement Bt11.

La construction génétique est intégrée en une seule copie et à un seul locus sur le bras long du chromosome 8. La construction est stable et héritée comme un caractère mendélien mono-locus.

Il n'y a pas de différence dans la séquence en acides aminés entre la toxine produite par la bactérie et celle qui est produite dans les plantes. Les plantes n'expriment qu'une partie du gène, la séquence de cette partie protéique est identique à celle qui est produite par les bactéries. La modification apportée à la séquence nucléotidique permet d'optimiser l'expression génétique du gène introduit en tenant compte de la dégénérescence du code génétique et de la fréquence, chez les plantes, des différents ARN de transfert.

L'entomotoxine produite par le maïs Bt 11 se comporte de la même manière vis à vis des protéases digestives puisque la protéine présente la même séquence en acides aminés bien que le nombre d'étape nécessaires pour aboutir à un cristal de protéine actif soient moins nombreuses.

Dans la mesure où l'entomotoxine initiale ne présente pas d'effet toxique sur l'homme, la version tronquée n'en présente pas plus.

3.2.3 Expression des gènes

La concentration maximale de protéine Btk se retrouve dans les feuilles, préférentiellement pendant la période juvénile du développement. La protéine est détectable dans tous les organes de la plante. Les concentrations, mesurées dans le grain et la feuille, sont respectivement de 1,4 µg et 3,26 µg par g de matière fraîche. Il est estimé que 90% du total de protéine Btk se localisent dans les feuilles de la plante. Pour la protéine *pat*, la concentration est de l'ordre de 80 ng par g de matière fraîche.

4. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE

4.1 Transfert de gène

Le gène *AmpR* ni aucun autre gène de résistance à un antibiotique ne sont présents dans l'OGM. En conséquence, il ne peut pas dans ce cas y avoir de risque de transfert de ce type de gène à la flore bactérienne intestinale ou du sol.

Les gènes *pat* et *Btk* sont sous le contrôle de séquences eucaryotiques non fonctionnelles dans des contextes procaryotiques. Dans l'éventualité d'un transfert de ces gènes de l'ADN de la plante à des bactéries, ils ne seraient pas fonctionnels. Dans tous les cas, aucune donnée expérimentale ne permet d'envisager que l'expression de tels gènes, même dans des micro-organismes, puisse avoir un effet négatif.

4.2 Sécurité des produits des gènes

La toxine produite par le gène *CryIA(b)* est hautement spécifique et son spectre d'hôte est étroit. Le cristal protéique est toxique par ingestion spécifiquement pour certaines espèces de lépidoptères foreurs de la tige. L'endotoxine apparaît sans effet toxique sur les autres espèces de lépidoptères non cible et les insectes des autres genres non cible. Aucun effet toxique de la protéine PAT ou de la protéine Btk n'a été observé lors des études visant à étudier leur toxicité par gavage oral de souris. Les protéines ne présentent pas non plus de caractéristiques propres à des allergènes connus.

Les études complémentaires conduites sur plusieurs espèces animales dont la liste figure en annexe 13 du dossier ne montrent pas davantage d'effet toxique.

Les analyses de composition effectuées à partir du matériel végétal considéré tendent à montrer que le maïs présente des équivalences en terme de composition par rapport à d'autres variétés de maïs issues de la sélection classique de variétés. Le Maïs Bt 11 se distinguant de ces autres variétés par sa résistance à certains insectes et sa tolérance à un herbicide non sélectif. Cette équivalence en substance explique l'absence de différence de comportement des animaux dans le cadre des essais d'alimentation effectués en utilisant d'une part du maïs Bt11 et d'autre part sa contrepartie conventionnelle. Pour cette même raison aucun effet adverse n'est attendu sur la faune sauvage susceptible de consommer ce maïs Bt 11 lors de sa culture.

En conclusion, il apparaît que la mise sur le marché de la lignée de maïs génétiquement modifiée Bt 11 est dans l'état actuel des connaissances sans risque

pour la santé publique y compris pour les personnes travaillant ou entrant en contact avec le maïs Bt11 ou se trouvant à proximité

5. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT

5.1 Dissémination potentielle des gènes par le pollen ou par les graines

Le risque d'échappement génétique est limité chez le maïs du fait de l'absence dans la flore européenne de plantes sexuellement compatibles. Le maïs présente un pouvoir de dispersion par la voie des graines très limité. On peut donc en conclure que le risque d'échappement de gène vers d'autres espèces est exclu.

La dispersion du pollen de maïs dans l'environnement est dépendante des conditions de vent de température et d'hygrométrie. Le pollen de maïs d'un poids relativement élevé ne présente pas une propriété de dispersion sur des distances longues, 80 % du nuage pollinique sédimente à moins de cinq mètres de la parcelle émettrice.

5.2 Evaluation d'éventuelles nouvelles caractéristiques de l'OGM

Le maïs n'est pas une culture envahissante bien qu'il ait un fort pouvoir compétiteur. Les repousses de maïs ne sont pas un problème en Europe. La plante est sensible au froid et les éventuelles repousses peuvent être efficacement contrôlées par les pratiques agricoles courantes, notamment par l'utilisation d'herbicides non sélectifs différents du glufosinate. Ainsi, le comportement de la lignée de maïs génétiquement modifiée considérée n'est pas différent de celui des variétés de maïs conventionnelles.

Les structures génétiques introduites n'ont pas modifié la morphologie de la plante et sa biologie de la reproduction. En conséquence, les caractéristiques concernant la vigueur, la compétitivité et la capacité à s'établir dans le milieu naturel ou agricole du maïs Bt11 ne sont pas différentes d'autres variétés de maïs. Les capacités de survie de ce maïs ne sont pas non plus différentes.

5.3 Sécurité pour les organismes non cible

Les essais de toxicité sur des organismes, non cibles, de la molécule insecticide, les essais de toxicité aiguë par gavage oral de souris, à de fortes doses de protéines, ainsi que les observations de terrain ne révèlent pas d'effets adverses sur les organismes non-cibles.

5.4 Emergence de résistances et de tolérances

La question de l'émergence de tolérance à l'herbicide total glufosinate dans la flore sauvage ne se pose pas dans le cas du maïs puisque l'espèce ne présente pas de compatibilité sexuelle avec des espèces de la flore européenne.

Le développement de souches d'insectes résistantes à la toxine Btk peut être prévenu en utilisant un mode d'utilisation particulier.

Dans le cas de cette lignée, le fort niveau d'expression de la protéine Btk dans la plante lui permet de contrôler à la fois les insectes sensibles et les insectes hétérozygotes pour un allèle de résistance. Il est généralement admis que le caractère de résistance est un caractère récessif.

5.5 Plan de surveillance et de monitoring

Le dossier propose un plan de monitoring visant à surveiller l'évolution de la résistance des insectes cibles à la toxine Bt. Les autres aspects (impact sur les arthropodes non cibles, impact de la tolérance à l'herbicide) sont renvoyés à une surveillance générale. Cette proposition semble cohérente si l'OGM est comparé avec sa version conventionnelle.

Dans le détail du plan de monitoring s'articule en quatre points : maintien de refuges (20 % pour les exploitations de plus de 5 ha de maïs), suivi de la résistance au Bt, plan d'action en cas de résistance avérée, formation des producteurs. Il apparaît cohérent et les arguments avancés pour justifier les choix qui sont faits s'appuient sur l'expérience de l'entreprise.

En conclusion, le plan est cohérent avec l'évaluation *a priori*, il reste toutefois à organiser sa mise en œuvre effective.

6. CONCLUSION GENERALE

En conclusion, il peut être considéré que, dans l'état actuel des connaissances, la mise sur le marché de la lignée de maïs génétiquement modifiée Bt11 ne présente pas plus de risque pour la santé publique et pour l'environnement que pour tout autre variété de maïs. La version actualisée du dossier conforte l'appréciation initialement faite.

EVALUATION REPORT

Application for consent to place on the market genetically modified maize (transformation event *Bt11*) which is resistant to lepidopteran pests of maize and tolerant to glufosinate ammonium, submitted by SYNGENTA SEEDS SAS on behalf of SYNGENTA SEEDS AG.

2. INTRODUCTION

Pursuant to Article 35 of Directive 2001/18/EC, the applicant has supplemented the dossier relating to its application for consent to place *Bt11* maize on the market with additional information required under the new directive, concerning in particular the arrangements for the identification, detection and traceability of this GMO, a surveillance and monitoring plan and the duration of the requested consent. On this occasion, the dossier has been updated to include recent information relating to the risk assessment of this GMO.

The dossier submitted for the application for consent in respect of the **SYNGENTA SEEDS SAS** genetically modified maize was drawn up in accordance with Directive 90/220/EEC. The dossier and its annexes describe the characteristics of the GMO and the studies carried out to assess the risks it poses to human health and the environment.

2. USE

This genetically modified line of maize is intended for the same uses as any other, conventional variety of maize. The application for consent concerns the cultivation, on European territory, of this genetically modified line of maize and any variety derived by sexual reproduction with this line. Community consent already exists for placing this line of maize on the market by way of importation (Commission Decision No 98/292/EC). Products intended for human consumption derived from it have also been notified under Regulation No 258/97 on novel foods and novel food ingredients.

3. DESCRIPTION OF THE PRODUCT

3.2 Transformation technique

The *Bt11* transformation event was achieved by introducing into maize protoplasts a DNA mixture corresponding to the large fraction of the plasmid pZO1502 cut by the restriction enzyme *NotI*. Plants are regenerated from cultures of the transformed cells.

3.3 Molecular and genetic description

3.3.1 The plasmid

The plasmid pZO1502 is derived from the plasmid pUC 18 and contains:

- ii) A truncated version of the *cryIA(b)* gene, isolated from *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* HDI (*Btk*), under the control of the CamV 35S promoter and *nos* 3' termination sequences. The IV6 intron from 1S maize alcohol dehydrogenase has been incorporated to enhance gene expression in monocotyledons. The gene causes the toxin *Btk* to be produced in the plant, which protects the plant against damage by the larvae of stem-boring lepidoptera (European corn borer and Mediterranean corn borer).
- iii) The *pat* gene, isolated from the Tü494 strain of the soil micro-organism *Streptomyces viridochromogenes*, placed under the control of the CamV 35S promoter and *nos* 3' termination sequences. The IV2 intron from 1S maize alcohol dehydrogenase has been incorporated to enhance gene expression in monocotyledons.
- iv) The plasmid pZO1502 contains the *ampR* gene, which confers resistance to the antibiotic Ampicillin. The gene was used as a marker for maintaining and selecting the plasmid when amplifying the plasmid in *E. coli* bacteria.
- v) DNA from the plasmid pUC 18 also contains portions of the *lacZ* and *lacI* genes and a segment containing the prokaryotic origin of replication, *ori*.

3.2.4 Genetic elements introduced into the GMO

The transgenic plant contains only the *pat* gene fusion, the *Btk* gene fusion, a fragment of DNA carrying the origin of replication, *ori*, and various sequences of synthetic DNA of biotechnological relevance.

Southern and PCR analyses show that the transgenic lines derived from the initial *Bt11* line do not carry the *ampR* gene. Thus no antibiotic resistance gene is present in the *Bt11* event.

The genetic construct is integrated as a single copy at a single locus on the long arm of chromosome 8. The construct is stable and is inherited as a single-locus Mendelian characteristic.

There is no difference in amino acid sequence between the toxin produced by the bacterium and that produced in the plants. Plants express only part of the gene; the sequence of this proteic part is identical to that produced by the bacteria. The modification made to the nucleotide sequence makes it possible to optimise expression of the introduced gene, taking into account degeneration of the genetic code and the frequency, in plants, of the various transfer RNAs.

The entomotoxin produced by *Bt11* maize behaves in the same way in relation to digestive proteases, since the protein has the same amino acid sequence although fewer stages are needed to produce an active protein crystal.

Since the initial entomotoxin does not have toxic effects on humans, neither does the truncated version.

3.2.5 Gene expression

The maximum concentration of *Btk* protein is found in the leaves, especially during the early stages of development. The protein is detectable in all parts of the plant. The concentrations measured in the grain and leaves are 1.4 µg and 3.26 µg respectively per g of fresh weight. It is estimated that 90% of all the *Btk* protein is located in the leaves of the plant. In the case of the *pat* protein, the concentration is about 80 ng/g of fresh weight.

6. ASSESSMENT OF HUMAN HEALTH RISKS

4.2 Gene transfer

Neither the *ampR* gene nor any other antibiotic resistance gene is present in the GMO. Consequently, there cannot in this case be any risk of transfer of such genes to the bacterial flora of the intestines or soil.

The *pat* and *Btk* genes are under the control of non-functional eukaryotic sequences in prokaryotic contexts. If such genes did transfer from the plant's DNA to bacteria, they would not be functional. In no case is there any experimental data to suggest that the expression of such genes, even in micro-organisms, could have an adverse effect.

4.3 Safety of gene products

The toxin produced by the *CryIA(b)* gene is highly specific and it has a narrow host spectrum. The proteic crystal is toxic by ingestion specifically in the case of certain species of stem-boring lepidoptera. The endotoxin appears not to have toxic effects on other, non-target species of lepidoptera or insects of other non-target genera. No toxic effect of the *pat* protein or the *Btk* protein has been observed in toxicity studies using oral gavage on mice. Nor do the proteins possess characteristics proper to known allergens.

Additional studies conducted on several animal species, listed in Annex 13 to the dossier, do not indicate any further toxic effects.

Composition analyses of the vegetable matter under consideration seem to indicate that, in terms of composition, equivalences exist between the maize and other varieties of maize produced by conventional forms of breeding. *Bt11* maize differs from such other varieties owing to its resistance to certain insects and its tolerance to a non-selective herbicide. Such equivalence explains the absence of differences in the behaviour of animals in the context of feeding trials carried out both with *Bt11* maize and with its conventional counterpart. For this same reason, no adverse effect on wild fauna which might eat *Bt11* maize whilst it is being grown is expected.

To conclude, it appears, according to present knowledge, that the placing on the market of the *Bt11* genetically modified line of maize poses no risk to human health or the

environment, including to people who work or come into contact with *Bt11* maize or who are in close proximity to it.

7. ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL RISKS

5.2 Potential gene dissemination by pollen or seed

The risk of gene escape is low in the case of maize, as the flora of Europe does not contain any plants which are sexually compatible. Maize possesses very limited powers of seed dispersal. It may therefore be concluded that there can be no risk of gene escape to other species.

Maize pollen dispersal into the environment depends on wind, temperature and humidity conditions. Maize pollen, which is relatively heavy, does not disperse over long distances, and 80% of the pollen cloud settles less than five metres from the land on which it originated.

5.6 Assessment of possible new characteristics of the GMO

Maize is not an invasive crop, although it is a strong competitor. Maize volunteers are not a problem in Europe. The plant is sensitive to the cold and any volunteers can be effectively controlled using current agricultural practices, in particular non-selective herbicides other than glufosinate. The genetically modified line of maize under consideration thus does not behave differently from conventional varieties of maize.

The introduced genetic structures have not modified the morphology of the plant or its reproductive biology. Consequently, the characteristics of *Bt11* maize as regards its vigour, its ability to compete and its ability to establish itself in natural or farm environments do not differ from those of other varieties of maize, and nor does its ability to survive.

5.7 Safety of non-target organisms

Toxicity trials with the insecticide molecule on non-target organisms, acute toxicity trials on mice using oral gavage, with high doses of proteins, and observations in the field have not revealed any adverse effects on non-target organisms.

5.8 Development of resistance and tolerance

The question of the development of tolerance in wild flora to the total herbicide, glufosinate, does not arise in the case of maize, as the species is not sexually compatible with species of European flora.

The development of strains of insects which are resistant to the *Btk* toxin can be prevented by employing a particular method of use.

In the case of this line, the high level of expression of the *Btk* protein in the plant allows it to control susceptible insects and insects which are heterozygous for a resistance allele. It is generally accepted that resistance is a recessive characteristic.

5.9 Surveillance and monitoring plan

The dossier proposes a monitoring plan designed to check for the development of target insect resistance to the *Bt* toxin. Other aspects (impact on non-target arthropods, impact of tolerance to the herbicide) are to be dealt with by means of general surveillance system. This proposal appears to be coherent if the GMO is compared with its conventional counterpart.

The monitoring plan breaks down into four parts: maintenance of refuges (20% in the case of holdings with over 5 ha of maize), monitoring of *Bt* resistance, action plan in the event of resistance being detected, and training for producers. It appears to be coherent, and the arguments advanced to justify the choices made are based on the company's experience.

To conclude, the plan is consistent with the *a priori* assessment, but its implementation in practice has yet to be organised.

6. CONCLUSION

To conclude, it may be considered that, according to present knowledge, the placing of the *Bt11* genetically modified line of maize on the market does not present a greater risk to human health or the environment than any other variety of maize. The updated version of the dossier confirms the initial assessment.