

Maisons-Alfort, le 10 novembre 2015

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées et aux aliments pour animaux génétiquement modifiés, du maïs génétiquement modifié MON87411, développé pour être résistant à certains insectes et tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2015-124)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 11 septembre 2015 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées et aux aliments pour animaux génétiquement modifiés, du maïs génétiquement modifié MON87411, développé pour être résistant à certains insectes et tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2015-124).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013¹ s'applique pour ce dossier.

¹ Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été effectuée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 15 octobre 2015. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices de l'EFSA² et³ et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous.

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le maïs est une culture des zones tempérées à tropicales. La France est le second producteur européen après l'Ukraine. Au niveau mondial, le maïs est la céréale la plus importante pour l'alimentation humaine et animale en production, la seconde après le blé en surface cultivée (FAOSTAT, 2013⁴) et 32 % du maïs cultivé était génétiquement modifié en 2013⁵.

Les plantes sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien sous forme de grains mûrs utilisés en alimentation animale ou humaine. Le maïs est également utilisé pour la production de biocarburants, de biogaz ou de bioplastique. Il est pauvre en protéines et la teneur des grains en deux acides aminés indispensables, la lysine et le tryptophane, est faible.

Les maïs MON87411 ont été génétiquement modifiés afin d'introduire dans leur génome :

- les gènes *cry3Bb1* et *cp4 epsps*, qui leur confèrent la résistance à certains coléoptères (*Diabrotica* spp.) et la tolérance au glyphosate,
- la cassette d'expression d'un ARN double brin (ARNdb) destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7* de *Diabrotica virgifera virgifera* par un mécanisme d'ARN interférence (ARNi), dans le but de conférer à la plante la résistance à cet insecte.

Il convient de rappeler que si ces maïs venaient à être importés, ils devraient satisfaire à la réglementation relative à l'utilisation des produits phytosanitaires sur ce type de plantes.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de ces maïs. Il ne concerne pas leur mise en culture.

² EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2011. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, The EFSA Journal 2011; 9(5): 2150, 37 pp.

³ Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, The EFSA Journal 2006; 99: 1-100.

⁴ <http://faostat.fao.org/>

⁵ James C (2013). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. *ISAAA Brief* No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur la lignée LH244.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été réalisée sur des embryons immatures avec la souche ABI d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le vecteur PV-ZMIR10871 utilisé pour la transformation porte les cassettes d'expression des trois gènes d'intérêt (*cry3Bb1*, *cp4 epsps* et ARNdb dirigé contre le gène *DvSnf7*) entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T. Aucun plasmide assistant (helper) ni ADN entraîneur (carrier) n'a été utilisé pour la transformation.

Les embryons ont été collectés après pollinisation, puis co-cultivés avec la souche ABI d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide PV-ZMIR10871 et désarmée de son pouvoir pathogène. Les cals transformés ont été sélectionnés sur un milieu de culture contenant du glyphosate (sélection des cellules végétales transformées) et de la carbénicilline (contre-sélection des agrobactéries). Ils ont ensuite été placés sur un milieu favorisant la différenciation des plantes. Enfin, les plantes transformées ont été transférées sur sol. Elles constituent la génération R₀. Les plantes R₀ ont été auto-fécondées et leur descendance R₁ a été analysée par PCR pour vérifier la présence de l'ADN-T.

L'ADN-T inséré dans le maïs MON87411 contient les cassettes d'expression des gènes *cry3Bb1*, *cp4 epsps* et de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSnf7*, dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 1) la cassette codant la toxine Cry3Bb1 comprend le promoteur du gène *plIG* de *Zea mays*, une séquence 5'UTR du gène codant la chlorophylle a/b-binding protein et une séquence intronique issue du gène codant l'actine 1 d'*Oryza sativa*, le gène *cry3Bb1* et le terminateur de la protéine heat-shock 17 de *Triticum aestivum*.
- 2) la cassette codant la protéine CP4 EPSPS est composée du promoteur, de la région 5'UTR et d'une région intronique du gène codant l'alpha-tubuline d'*Oryza sativa*, d'une séquence d'adressage de la protéine au chloroplaste issue du gène de la shikimate synthétase d'*Arabidopsis thaliana*, du gène *cp4 epsps* et du terminateur de l'alpha-tubuline d'*Oryza sativa*.
- 3) la cassette codant l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSnf7* comprend le promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), une séquence intronique issue du gène *hsp70* de *Zea mays*, un fragment de 240 nucléotides du gène *DvSnf7* et sa séquence complémentaire, séparés par 149 nucléotides, et la séquence du terminateur de la petite sous-unité de la RuBisCO de *Pisum sativum*.

Les gènes *cry* codent des entomo-toxines issues de la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Les toxines codées par les différents gènes *cry* sont actives contre une large gamme d'insectes. En revanche, chacune d'elle est très spécifique. Cry3Bb1 a été modifiée par le pétitionnaire pour une activité insecticide optimale contre certains coléoptères, tels que *Diabrotica* spp.

Le gène *cp4 epsps* code une 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase isolée de la souche CP4 d'*A. tumefaciens*, qui est peu sensible au glyphosate et confère à la plante la tolérance à cet herbicide.

Le gène *DvSnf7* de *D. virgifera virgifera* code la protéine SNF7, qui est un composant du complexe ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Ce complexe est impliqué dans des processus biologiques fondamentaux, en particulier le tri des récepteurs membranaires

adressés aux lysosomes. L'inactivation de l'orthologue de ce gène est létale dans des organismes tels que la drosophile et *Caenorhabditis elegans*. Chez *D. virgifera virgifera*, le pétitionnaire a montré dans des travaux publiés dans des revues internationales à comité de lecture que dans les cellules déficientes en protéine SNF7, les mécanismes d'ubiquitination, d'autophagie et l'activité lysosomale sont perturbés.

Dans le maïs MON87411, c'est l'inactivation du gène *DvSnf7* dans les larves de *D. virgifera virgifera* qui est visée. La transcription des séquences présentes dans la cassette d'expression conduit à la formation d'un ARN double brin qui est reconnu par les RNases Dicer et clivé en petits ARN interférents (ARNsi). Dans les cellules de *D. virgifera virgifera*, ces ARNsi longs de 21 nucléotides sont incorporés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui reconnaît l'ARNm complémentaire issu de la transcription du gène *DvSnf7* et le clive, conduisant ainsi à son inactivation.

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

L'analyse moléculaire du maïs MON87411 a été réalisée à l'aide d'une combinaison de techniques : d'une part, Next Generation Sequencing et analyse des séquences de jonction (NGS/JSA) entre l'ADN-T et l'ADN génomique de la plante et d'autre part, séquençage de l'insert et des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert. Cette analyse a été réalisée sur les maïs LH244 et MON87411 (générations R₄, R₅, R₆, R₄F₁ (HCL645 x LH244) et R₅F₁ (LH244 x LH287)).

Les résultats montrent :

- une insertion unique de l'ADN-T contenant une copie intacte de chacune des trois cassettes,
- une délétion de 118 nucléotides dans le génome de la plante au site d'insertion,
- l'absence de séquences issues du vecteur plasmidique.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'ORF putative, sur l'ADN-T et au niveau des jonctions, présentant des homologies avec des gènes codant une toxine ou un allergène connu. La modification génétique ne semble pas avoir interrompu un gène du maïs.

Les quantités de protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS produites dans les grains et le fourrage du maïs MON87411 ont été mesurées par des tests ELISA. L'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* a été quantifié avec le système QuantiGene® Plex 21.0 d'Affymetrix. Les mesures ont été réalisées sur le fourrage et les grains récoltés respectivement au stade ensilage (R5) et au stade mature (R6). Les plantes ont été cultivées avec ou sans traitement herbicide avec du glyphosate (respectivement T et NT) sur 8 sites en Argentine durant la saison 2011/2012. Il n'est pas possible de savoir si le maïs NL6169, utilisé comme comparateur non génétiquement modifié, est acceptable, en l'absence de données sur le lien entre ce génotype et celui utilisé pour la transformation initiale.

Les concentrations moyennes de protéine Cry3Bb1 sont comprises entre 3,3 et 4,0 µg/g de matière sèche dans les grains et entre 35 et 39 µg/g de matière sèche dans le fourrage. Pour la protéine CP4 EPSPS, ces valeurs sont comprises entre 1,9 et 2,3 µg/g de matière sèche dans les grains et entre 7,1 et 8,0 µg/g de matière sèche dans le fourrage. Enfin, l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* est présent à des concentrations comprises entre 0,104 x 10⁻³ et 0,185 x 10⁻³ µg/g de matière sèche dans le grain et entre 4,26 x 10⁻³ et 8,77 x 10⁻³ µg/g de matière sèche dans le fourrage.

Une analyse de ségrégation a été réalisée. Elle permet de conclure que l'insertion est stable, unique et à hérédité mendélienne.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire du maïs génétiquement modifié MON87411 est incomplète. En effet, il manque des informations relatives au génotype NL6169 utilisé comme comparateur pour l'analyse des quantités de protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS et d'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* dans les grains et le fourrage du maïs MON87411. Par ailleurs, l'évaluation du risque d'effets indésirables ("off-target effects") dans la PGM et chez l'animal qui consommera cette PGM n'a pas été réalisée spécifiquement avec la séquence de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7*.

II.1.3. Evaluation comparative

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Le maïs MON87411 est comparé avec la variété témoin NL6169 et 20 (analyse de composition) et 22 (caractérisation agronomique et phénotypique) variétés commerciales non génétiquement modifiées choisies pour représenter la variabilité génétique, phénotypique, agronomique et de composition chimique des variétés de maïs commerciales. De même que précédemment, le pétitionnaire indique que le maïs NL6169 a un fonds génétique proche de celui du maïs MON87411, mais les éléments fournis dans le dossier ne permettent pas de le vérifier.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Pour l'analyse de composition chimique des grains et du fourrage, ainsi que l'analyse des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, le maïs MON87411, la variété témoin et les 22 variétés commerciales (4 variétés par site) ont été cultivés sur 8 sites en Argentine pendant la saison 2011/2012. En mars 2015, l'EFSA a demandé des précisions sur le positionnement géographique de ces sites. Il serait effectivement intéressant de savoir s'ils représentent un large panel de conditions pédoclimatiques et de pratiques agronomiques.

Sur chaque site, le maïs MON87411 a été cultivé avec ou sans traitement herbicide avec du glyphosate (respectivement T et NT). Chaque modalité (variété témoin, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée T et NT) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés.

Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations de l'EFSA (2011).

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) en regroupant les résultats de tous les sites expérimentaux. Les ANOVA sont réalisées avec un modèle linéaire mixte incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du maïs MON87411 NT ou T, de la variété témoin ou des variétés commerciales),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale", correspond à celui proposé par l'EFSA (2011).

Le maïs MON87411 est comparé à la variété témoin par des tests de différence et aux variétés commerciales par des tests d'équivalence. Les erreurs de type 1 retenues par le pétitionnaire sont de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par l'EFSA (2010)⁶, en classant les variables en 4 catégories selon les résultats du test d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence. Pour certains paramètres, il n'est pas possible de conclure, car l'absence de variabilité entre les variétés commerciales pour ces paramètres ne permet pas de

⁶ Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, The EFSA Journal 2010; 8(1):1250.

déterminer les limites d'équivalence. C'est le cas de la teneur en matière grasse du fourrage et du paramètre "nombre d'épis tombés à la récolte" (caractérisation agronomique et phénotypique) pour le maïs MON87411 NT.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de composition a été réalisée selon le document consensus de l'OCDE (2002)⁷.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 62 composés (53 pour les grains et 9 pour le fourrage) parmi les 78 analysés sont utilisables pour les analyses statistiques. L'analyse combinée de l'ensemble des sites d'expérimentation montre que le maïs MON87411 (grains et fourrage) est équivalent aux variétés commerciales. La seule exception est la teneur en acide palmitique dans les grains du maïs MON87411 NT (non équivalence et différence significative (catégorie IV et type 7)). Les valeurs mesurées sur le maïs MON87411 et la variété témoin NL6169 sont très proches (13,68 % vs 13,62 %), avec des plages de variation similaires. En revanche, les grains des variétés commerciales sont plus pauvres en cet acide gras (11,32 %), avec une plage de variation non incluse dans celles du maïs MON87411 et du témoin. En fait, les profils en acides gras de ces deux maïs sont très proches mais un peu décalés par rapport à ceux des maïs commerciaux. D'un point de vue nutritionnel, ces différences sont négligeables.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 13 paramètres. Le maïs MON87411, NT ou T, apparaît équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique, à l'exception de la tolérance au glyphosate.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs MON87411 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels mais ne présente aucune analyse des produits transformés.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

La caractérisation agronomique et phénotypique et l'analyse de composition du maïs MON87411 montrent que ce maïs est équivalent aux variétés conventionnelles pour les grains et le fourrage, à l'exception de la teneur en acide palmitique dans les grains, qui est légèrement plus élevée que celle des variétés commerciales. Cette différence n'est pas évocatrice d'un risque pour une utilisation en alimentation animale et humaine de ce maïs.

Aucune analyse n'a été réalisée sur les produits issus du maïs MON87411.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Les protéines Cry sont des delta-endotoxines qui ne sont activées que dans l'environnement alcalin de l'intestin des insectes, où elles se lient à des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, conduisant à la formation de pores et à la lyse cellulaire. L'absence de toxicité pour les mammifères s'explique par leur dégradation dans le milieu acide stomacal et l'absence de récepteurs.

La sécurité d'utilisation de la protéine Cry3Bb1a été précédemment rapporté (Cannon, 1993⁸ ; IPCS, 1999⁹ ; US EPA, 1988¹⁰). Par ailleurs, cette protéine est l'un des ingrédients actif d'un

⁷ OECD. 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 No. 6. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France), 2002.

biopesticide (Raven® oil, Baum *et al.*, 1999¹¹). Enfin, elle est présente dans des plantes génétiquement modifiées précédemment autorisées (maïs MON88017 et MON863 par exemple).

L'évaluation de la sécurité de la protéine Cry3Bb1 est fondée sur les données suivantes :

- la protéine Cry3Bb1 présente de fortes analogies de séquence avec des protéines de la même famille qui sont très répandues dans de nombreux organismes vivants (végétaux et micro-organismes) et ont par conséquent un historique d'utilisation sûre dans l'alimentation.
- une analyse *in silico*, réalisée à l'aide de bases de données actualisées (2014), montre que la protéine Cry3Bb1 ne présente pas d'homologie de séquence avec des protéines toxiques ou allergiques connues et répertoriées dans ces bases de données.
- la protéine est présente en très faible quantité dans les parties de la plante qui sont consommées.
- une protéine produite à l'aide d'une souche d'*E. coli*, dont l'équivalence (structure, propriétés physico-chimiques et activité enzymatique) avec la protéine Cry3Bb1 du maïs MON87411 a été démontrée, n'induit pas de mortalité chez la souris à la dose maximale de 1930 mg/kg de poids corporel (p.c.) administrée par voie orale (gavage).
- la protéine est rapidement dégradée en condition de digestion gastrique simulée (SGF) et en condition de digestion intestinale simulée (SIF), et elle perd son activité fonctionnelle sous l'effet de températures élevées.

La protéine EPSPS est présente à l'état naturel dans de nombreux organismes vivants (plantes, microorganismes, champignons, algues, etc.). La structure et la fonction de la protéine CP4 EPSPS du maïs MON87411 sont similaires à celles des enzymes EPSPS végétales naturelles. Cette protéine est identique à plus de 99 % (100 % dans certains cas) à celle de plantes génétiquement modifiées précédemment autorisées (maïs MON88017 et MON863 par exemple).

L'évaluation de la sécurité de la protéine CP4 EPSPS est fondée sur les données suivantes :

- la protéine CP4 EPSPS présente de fortes analogies de séquence avec des protéines de la même famille qui sont très répandues dans de nombreux organismes vivants (végétaux et micro-organismes) et ont par conséquent un historique d'utilisation sûre dans l'alimentation.
- une analyse *in silico*, réalisée à l'aide de bases de données actualisées (2014), montre que la protéine CP4 EPSPS ne présente pas d'homologie de séquence avec des protéines toxiques ou allergiques connues et répertoriées dans ces bases de données.
- la protéine est présente en très faible quantité dans les parties de la plante qui sont consommées.
- une protéine produite à l'aide d'une souche d'*E. coli*, dont l'équivalence (structure, propriétés physico-chimiques et activité enzymatique) avec la protéine CP4 EPSPS du maïs MON87411 a été démontrée, n'induit pas de mortalité chez la souris à la dose maximale de 572 mg/kg p.c. administrée par voie orale (gavage).
- la protéine est rapidement dégradée en condition de digestion gastrique simulée (SGF) et en condition de digestion intestinale simulée (SIF), et elle tend à perdre son activité fonctionnelle sous l'effet de températures élevées.

⁸ Cannon RJC (1993). Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science*, 37: 331-335.

⁹ WHO (1999). Microbial pest control agent: *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria 217. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

¹⁰ US EPA, 1988. Guidance for the reregistration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. U.S. Environmental Protection Agency, NTIS PB 89-164198.

¹¹ Baum JA, Johnson TB et Carlton BC (1999). *Bacillus thuringiensis*: natural and recombinant bioinsecticide products. In Hall FR et Menn JJ, Eds., *Methods in biotechnology*, Vol. 5 Biopesticides: use and delivery, pp. 189-209. Humana Press, Totowa, New Jersey.

L'ensemble des données fournies sur ces deux protéines, Cry3Bb1 et CP4 EPSPS, conduit le pétitionnaire à justifier l'absence d'étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur. Compte tenu de l'historique de consommation de ces protéines, cette position est recevable. En revanche, l'évaluation de la sécurité de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* n'est pas suffisamment documentée, dans la mesure où l'étude de toxicité de 28 jours fournie par le pétitionnaire a été réalisée avec d'autres ARN.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

Les gènes introduits dans le génome du maïs MON87411 n'ont pas pour objectif de modifier sa composition. Par ailleurs, la composition de ce maïs est équivalente à celle de variétés de maïs conventionnelles. Dans ces conditions, le pétitionnaire estime à juste titre qu'il n'y a pas lieu d'analyser d'autres constituants.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou aliments pour animaux dérivés du maïs MON87411.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

L'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été réalisée en 2013, selon la ligne directrice OCDE 408¹² et le guide EFSA (2011)¹³ relatif à ce type d'études et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Les farines de grains de maïs ont été incorporées dans les régimes alimentaires à la dose de 33 % uniquement. Les contrôles réalisés sur les grains de maïs MON87411 et de la variété témoin (NL6169) ont notamment porté sur la présence de pesticides et sur des mycotoxines. Des contrôles ont également été réalisés sur les aliments distribués. Ils ont notamment porté sur les métaux lourds, les aflatoxines et les pesticides.

Deux groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Sprague Dawley, ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant respectivement 33 % de la variété témoin NL6169 et 33 % de la variété génétiquement modifiée MON87411 traitée avec du glyphosate. De même que précédemment, le pétitionnaire indique que le maïs NL6169 a un fonds génétique proche de celui du maïs MON87411, mais les éléments fournis dans le dossier ne permettent pas de le vérifier. Le nombre d'animaux (16 rats/groupe/sexe) a été déterminé sur la base d'une analyse de la puissance des tests statistiques. Il correspond aux recommandations de l'Anses (2011)¹⁴ et de l'EFSA (2011)¹⁵ en la matière.

Le pétitionnaire a réalisé des ANOVA et des tests de comparaison des moyennes entre groupes. L'erreur de type 1 a été fixée à 5 % et 1 %. Les analyses ont été réalisées séparément pour les mâles et les femelles. Des modèles mixtes prenant en compte les corrélations entre mesures

¹² OCDE (1998). Guideline for testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris, France.

¹³ EFSA Scientific Committee; 2011. EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. EFSA Journal 2011;9(12): 2438 [21 pp.].

¹⁴ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2011). Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective, 95 pages.

¹⁵ EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. The EFSA Journal 2011; 9(12):2438.

répétées dans le temps sur un même animal (poids et consommation) ont été utilisés. Les données brutes et les programmes sous format électronique ne sont pas fournis.

Les quelques différences significatives observées entre le groupe témoin et le groupe traité ne sont pas biologiquement pertinentes. Dans ces conditions, et en l'absence de signes lésionnels macro- ou microscopiques, ces différences ne permettent pas de conclure à un effet toxique.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Les données de sécurité relatives aux protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS et les résultats de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours ne mettent pas en évidence de risque sanitaire lié à la consommation de ce maïs. En revanche, l'évaluation spécifique du potentiel toxique de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* n'est pas suffisamment documentée.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s)

Considérant que la synthèse de protéines correspondant à l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* est improbable et que l'analyse des séquences de l'insert et des régions flanquantes ne révèle pas d'homologie avec des allergènes ou des toxines avérés, le pétitionnaire a focalisé l'étude de l'allergénicité sur les deux protéines, Cry3Bb1 et CP4 EPSPS, exprimées dans le maïs MON87411. Il suit les recommandations de la Commission du Codex Alimentarius (2009)¹⁶, qui sont proches de celles du guide EFSA (2011), et fonde l'évaluation de l'allergénicité de ces deux protéines sur quatre critères :

- 1) absence d'allergénicité connue des organismes sources (*Bacillus thuringiensis* pour Cry3Bb1 et *Agrobacterium sp.* Strain CP4 pour CP4 EPSPS).
- 2) absence d'homologie de séquence entre les deux protéines, Cry3Bb1 et CP4 EPSPS, et des allergènes connus lorsque la recherche est effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus.
- 3) faible résistance des deux protéines à la protéolyse digestive.
- 4) faible teneur en protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS des grains du maïs MON87411.

Les analyses bioinformatiques ne montrent aucune homologie de séquence entre les deux protéines, Cry3Bb1 et CP4 EPSPS, et les adjuvants classiques comme les toxines ou les lectines. Les faibles teneurs de ces protéines dans le maïs MON87411 et leur sensibilité aux protéases digestives sont *a priori* incompatibles avec un éventuel effet adjuvant significatif dans le cadre d'un apport alimentaire modéré en maïs génétiquement modifié.

Le pétitionnaire n'a pas abordé ni discuté le problème (controversé) du caractère adjuvant des protéines Cry soulevé dans plusieurs publications. Ce point aurait mérité une discussion de la part du pétitionnaire.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

Le pétitionnaire rappelle, à juste titre, que le maïs n'est pas considéré comme un allergène alimentaire majeur. Il ne figure pas dans la liste des allergènes dont l'étiquetage est obligatoire. En France, les statistiques du Réseau d'Allergo-Vigilance (RAV), qui recense les cas d'allergie alimentaire graves (chocs anaphylactiques), ne mentionnent pas le maïs dans la liste des 10 premiers allergènes dangereux (qui représentent 60 % des urgences allergologiques).

Par ailleurs, aucune des informations disponibles au sujet du maïs MON87411 ne laisse supposer que ce maïs puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de maïs

¹⁶ Codex Alimentarius Commission (CAC), 2009. Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology, Codex Alimentarius Commission, 85 p.

conventionnelles. Le risque allergénique du maïs MON87411 est faible et *a priori* équivalent à celui des variétés de maïs conventionnelles.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des données et des commentaires fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS exprimées dans le maïs MON87411 peut être considéré comme négligeable. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, l'allergénicité du maïs MON87411 reste identique à celle du maïs conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le maïs MON87411 et les variétés commerciales conventionnelles.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prédiction de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

L'estimation de la consommation de maïs chez l'animal est basée sur les données de l'OCDE (2009)¹⁷. Dans un scénario du "pire des cas", la consommation des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS est au maximum de 0,009 % et 0,005 % de l'ingéré protéique total, respectivement, pour les poulets, les porcs et les vaches laitières.

En se basant sur la plus forte consommation de maïs chez l'Homme adulte ou l'enfant (maïs doux ou popcorn), les consommations des deux protéines, Cry3Bb1 et CP4 EPSPS, et de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* sont de 31,5 ou 12,3 µg/kg p.c./j, 15,3 ou 6,0 µg/kg p.c./j, 0,003 ou 0,001 µg/kg p.c./j, respectivement. Par ailleurs, la consommation quotidienne d'acides nucléiques *via* les aliments est estimée à environ 1-2 g chez l'Homme (Suchner *et al.*, 2000¹⁸). Dans le cas d'un enfant de 10 kg, cela correspondrait à 0,2 g/kg p.c./j, à rapprocher de la teneur en ARN dirigé contre le gène *DvSnf7*, qui est inférieure à 3 ng/kg p.c./j.

II.3 Caractérisation des risques

En considérant les doses sans effet toxique des études par administration unique, les marges d'exposition pour les protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS sont respectivement de $6,1 \times 10^4$ et $3,7 \times 10^4$ chez l'enfant et $1,6 \times 10^5$ et $9,6 \times 10^4$ chez l'adulte.

Les études réalisées avec les protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS et l'étude 90 jours menée avec le maïs MON87411 n'ont pas mis en évidence de risque pour la santé humaine ou animale lié à la consommation de maïs MON87411. Toutefois, les risques liés à la consommation de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* n'ont pu être caractérisés du fait de l'absence de dose sans effet toxique identifiée pour ce type de composé.

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

La caractérisation moléculaire du maïs génétiquement modifié MON87411 est incomplète. La caractérisation phénotypique et agronomique et l'analyse de composition de ce maïs montrent qu'il est équivalent aux variétés conventionnelles pour les grains et le fourrage. L'évaluation de la sécurité des protéines Cry3Bb1 et CP4 EPSPS exprimées dans le maïs MON87411 ne met pas en

¹⁷ [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)31&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)31&doclanguage=en)

¹⁸ Suchner U, Kuhn KS et Furst P (2000). The scientific basis of immunonutrition. Proceedings of the Nutrition Society, 59: 553-563.

évidence d'éléments permettant de conclure que ces protéines ont un effet toxique sur la santé humaine et animale. L'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat ne met pas en évidence d'effets ayant une signification biologique. Sur la base des éléments fournis dans le dossier, le potentiel allergénique des produits dérivés de ce maïs paraît extrêmement faible. En revanche, l'évaluation de la sécurité de l'ARN dirigé contre le gène *DvSnf7* n'est pas suffisamment documentée.

Dans ces conditions le GT « Biotechnologie » ne peut se prononcer sur la sécurité sanitaire du maïs MON87411.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie ». Sur la base du dossier initial disponible dans les délais prévus, l'Agence émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n°1829/2003, du maïs génétiquement modifié MON87411.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

OGM, maïs MON87411, résistance aux coléoptères, Cry3Bb1, ARNi, tolérance au glyphosate, CP4 EPSPS