

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 13 avril 2011

AVIS

en réponse à la saisine **110126-saisine HCB- dossier 2010-83**¹
concernant le dossier **EFSA-GMO-UK-2010-83**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 4 février 2011 par les autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-UK-2010-83 portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié MIR604 pour la culture.

Ce dossier a été déposé par la société Syngenta dans le cadre du règlement (CE) 1829/2003 auprès de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (AESA), sous la référence **EFSA-GMO-UK-2010-83**. La saisine du HCB correspondante est référencée **110126-saisine HCB-dossier 2010-83**.

Dans le cadre du règlement (CE) 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est centralisée par l'AESA. Les Etats membres disposent de trois mois pour envoyer leurs commentaires en contribution à l'évaluation du dossier. Dans ce cadre, l'avis du HCB prend la forme de commentaires à destination de l'AESA.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 9 mars 2011 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Les commentaires du HCB à destination de l'AESA sont transmis par ce rapport aux autorités françaises.

¹ La saisine « **110126-saisine HCB- dossier 2010-83** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS est indiquée dans l'Annexe 2.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
1.1. CONTEXTE ET ENJEU DE LA SAISINE	3
1.2. PRÉSENTATION DU DOSSIER	4
2. COMMENTAIRES À DESTINATION DE L'AESA.....	5
2.1. REMARQUES GÉNÉRALES	5
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DÉFINIES PAR L'AESA	5
3. BIBLIOGRAPHIE	13
ANNEXE 1 : SAISINE	15
ANNEXE 2 : ELABORATION DES COMMENTAIRES	16
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS À DESTINATION DE L'AESA....	17
A3.1. GENERAL COMMENTS.....	17
A3.2. COMMENTS PER SECTION.....	17

1. Introduction

1.1. Contexte et enjeu de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 4 février 2011 par les autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-UK-2010-83, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié MIR604 pour la culture. Le maïs MIR604 bénéficie par ailleurs d'une autorisation de la Commission européenne de mise sur le marché à des fins alimentaires pour l'homme et l'animal (EC, 2009). Le dossier EFSA-GMO-UK-2010-83 a été déposé par la société Syngenta dans le cadre du règlement (CE) 1829/2003³ (EC, 2003) auprès de l'AESA⁴.

Dans le cadre du règlement (CE) 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées est centralisée par l'AESA, qui doit transmettre son opinion à la Commission européenne dans un délai de six mois à compter de la date de validation du dossier – En pratique, cette période de six mois peut être allongée au cas où une demande d'information supplémentaire est adressée au pétitionnaire. Les Etats membres disposent d'un délai ferme de trois mois pour envoyer leurs commentaires en contribution à l'évaluation du dossier. C'est dans ce cadre que le HCB a été saisi ; l'avis du HCB prend donc la forme de commentaires à destination de l'AESA.

L'enjeu de cet avis du HCB est donc de contribuer à l'évaluation du dossier par l'AESA. Les commentaires des Etats membres, dès réception par l'AESA, sont transmis d'une part aux experts de trois groupes de travail du panel OGM⁵ de l'AESA (Analyse moléculaire, Alimentation humaine et animale, Environnement), et d'autre part au pays auquel l'AESA a délégué l'évaluation du risque environnemental, en l'occurrence l'Allemagne.

Les groupes de travail de l'AESA examinent les commentaires des Etats membres, les intègrent dans leur analyse des dossiers, et, quand ils le jugent pertinent, les transmettent au pétitionnaire sous forme de question pour clarification ou demande d'information supplémentaire. Si tous les commentaires ne sont pas nécessairement transmis au pétitionnaire, ils font tous l'objet d'une réponse spécifique par l'AESA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'AESA, sont rendus publics, en annexe de l'opinion scientifique de l'AESA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'AESA est très cadrée. Les Autorités compétentes des Etats membres sont invitées à poster des commentaires en ligne, en anglais, dans des formulaires distincts pour chaque section des dossiers. Les sections sont basées sur la structure des dossiers recommandée dans les lignes directrices de l'AESA relatives à l'évaluation environnementale des plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2006). Ces commentaires doivent être ciblés sur des demandes spécifiques adressées à l'AESA, soit pour une demande de clarification ou d'information supplémentaire de la part du pétitionnaire, soit pour la prise en compte de remarques spécifiques dans son évaluation des dossiers et l'élaboration de son opinion scientifique.

Par cet avis, le Comité scientifique (CS) du HCB transmet aux Autorités compétentes françaises des commentaires destinés à l'AESA en français, avec une traduction en anglais en annexe.

³ Le règlement (CE) 1829/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments, consistant en, ou contenant des, ou issus d'organismes génétiquement modifiés, pour l'alimentation humaine et animale.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>

⁴ AESA : Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : *European Food Safety Authority*.

⁵ OGM : organismes génétiquement modifiés

1.2. Présentation du dossier

Le maïs génétiquement modifié MIR604 porte une construction génétique composée de plusieurs séquences d'ADN, dont deux séquences codantes : le gène synthétique *mcry3A* codant un polypeptide dérivé de la protoxine Cry3A de *Bacillus thuringiensis*⁶, et le gène *pml* d'*Escherichia coli*⁷ codant la phosphomannose isomérase (PMI), utilisé comme marqueur de transformation.

Le gène *mcry3A* est une version synthétique et modifiée du gène *cry3A* de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*. La protéine Cry3a produite par *B. thuringiensis* est une δ -endotoxine possédant une activité insecticide spécifique vis-à-vis de certaines espèces de coléoptères, notamment des chrysomèles. Le gène *cry3A* a été modifié de façon à élargir le spectre d'action de la toxine aux chrysomèles *Diabrotica virgifera virgifera* et *D. longicornis barberi* (western et northern corn rootworm, respectivement), qui provoquent des dégâts importants dans les cultures de maïs en Amérique du Nord. La présence de la chrysomèle *D. virgifera virgifera* est attestée en Europe depuis 1992 (Miller et al., 2005); plusieurs foyers européens se seraient développés à partir de trois introductions indépendantes provenant d'Amérique du Nord (Miller et al., 2005), faisant de cette chrysomèle une espèce aliène invasive en Europe.

La modification majeure du gène *cry3A* concerne l'introduction d'un site de clivage permettant à la protéine mCry3A d'être activée par les protéases contenues dans le tube digestif des larves de *D. virgifera* (Carroll et al., 1997; Walters et al., 2008). Cette modification ne change pas le mode d'action de la protéine, qui, après activation par clivage, se fixe sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules intestinales des coléoptères. Il a été démontré qu'une protéine de type cadhérine est un récepteur de Cry3A dans le cas du coléoptère *Tenebrio molitor* (Fabrick et al., 2009). Plusieurs résultats suggèrent que Cry3A a un mode d'action similaire chez *D. virgifera* (Fabrick et al., 2009; Park et al., 2009). Le spectre d'activité insecticide de la protéine mCry3A, bien qu'élargi à *D. virgifera virgifera* et *D. longicornis barberi*, reste ainsi étroit et spécifique à certains insectes coléoptères (Part 1, appendix 1 "Characterization of Modified Cry3A Protein", page 20).

L'enzyme PMI catalyse la formation de fructose à partir de mannose, et permet donc à la plante d'utiliser le mannose comme source de carbone. Alors que l'accumulation de mannose dans les plantes conduit à une inhibition de croissance, le fructose entre dans la glycolyse et a de ce fait un rôle significatif dans le métabolisme ; il est aussi un régulateur de l'expression des gènes du métabolisme. Le mannose a été utilisé pour compléter le milieu de culture des cals embryogéniques issus de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* pour sélectionner ceux qui exprimaient PMI.

L'événement MIR604 correspond à l'insertion d'une copie unique de la cassette portant les deux gènes, en un locus unique d'insertion. L'étude de la descendance en ségrégation résultant d'autofécondations ou de rétrocroisements, sur cinq ou six générations, indique le caractère mendélien des transgènes et leur stabilité.

La séquence de l'insert a été établie en totalité, ainsi que celles de 1,5 kb des régions génomiques flanquantes. Trois modifications ont été observées dans l'insert. La première se situe dans le promoteur MTL, contrôlant la transcription du gène *mcry3A*, et n'affecte de toute évidence pas son activité. Les deux autres sont situées dans le gène *pml* et se traduisent par une variation des deux acides aminés correspondants. La protéine PMI modifiée présente toutefois les caractéristiques attendues. L'événement de transformation n'a causé l'interruption d'aucune séquence codante ou régulatrice connue ou reconnaissable du maïs.

La protéine mCry3A a été détectée dans tous les tissus de la plante sauf dans le pollen. La protéine PMI s'exprime dans tous les tissus, dont le pollen.

⁶ *Bacillus thuringiensis* est une bactérie naturellement omniprésente dans les sols.

⁷ *Escherichia coli* est une bactérie naturellement omniprésente dans la flore commensale des vertébrés, incluant les hommes.

En complément de son précédent dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs MIR604 à des fins alimentaires pour l'homme et l'animal (EFSA-GMO-UK-2005-11), le pétitionnaire présente ici l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires de la culture du maïs MIR604 en Europe.

Le CS du HCB propose d'envoyer les remarques suivantes à l'AESA concernant les points du dossier identifiés comme critiquables.

2. Commentaires à destination de l'AESA

2.1. Remarques générales

1. Globalement, le dossier ne se réfère qu'à des zones de culture en conditions tempérées. Le pétitionnaire devrait systématiquement considérer dans son évaluation de risques que l'Union européenne comprend également des terres en zones tropicales qui pourraient être concernées par la culture du maïs. C'est par exemple le cas pour certains des DOM-COM (Départements et Collectivités d'Outre Mer) du territoire français.
2. Les tests individuels de comparaison sont correctement mis en œuvre, avec l'utilisation de modèles mixtes quand il s'agit de bien différencier certains effets fixes de certains effets aléatoires. En revanche, seules des études de comparaison sont effectuées pour déterminer si des différences sont statistiquement significatives : aucune étude de puissance n'est proposée, aucun test d'équivalence n'est réalisé, la multiplicité des tests n'est pas prise en compte. Les recommandations de l'AESA allant dans ce sens pour les analyses de composition (EFSA, 2010) ne sont pas suivies.

2.2. Commentaires par sections définies par l'AESA

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections de dossier définies par l'AESA, et aux différents formulaires mis à disposition par l'AESA pour la collecte de commentaires en ligne. Seules les sections pour lesquelles le HCB transmet des commentaires sont indiquées ici. Chaque commentaire est écrit de manière indépendante. La somme des commentaires n'est pas destinée à constituer un texte en soi.

B. INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL PLANTS

2. (b) Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species

Le CS du HCB s'accorde sur le fait qu'il n'existe pas d'espèces interfécondes avec le maïs en Europe « continentale ». Cela dit, le dossier n'envisage pas l'existence potentielle d'espèces interfécondes dans les DOM-COM dans lesquels le maïs pourrait être cultivé, comme les Antilles françaises ou la Guyane française.

3. Survivability (b) specific factors if any affecting survivability

Le pétitionnaire devrait spécifier les conditions environnementales particulières nécessaires à la survie du maïs, sans omettre que le maïs peut être cultivé sous un climat tropical, que l'on peut trouver dans certains DOM-COM.

5. Geographical distribution and cultivation of the plant, including the distribution in Europe of the compatible species

Cette section devrait considérer la possibilité de culture de maïs et la présence potentielle d'espèces compatibles dans les DOM-COM, en particulier dans les Antilles françaises.

D. INFORMATION RELATING TO THE GM PLANT

6. Any change to the ability of the GM plant to transfer genetic material to other organisms

(a) Plant to bacteria gene transfer

Le CS du HCB pense que les probabilités de transfert des transgènes de cette plante aux bactéries sont extrêmement faibles et les conséquences de tels événements, s'ils venaient à se produire, seraient négligeables pour la santé humaine ou animale et pour l'environnement. Cela dit, l'affirmation du pétitionnaire (p. 50) :

"In conclusion, no change in the ability of MIR604 maize to transfer genetic material to other organisms is observed when compared to conventional maize."

est inexacte, considérant que la construction génétique contient des gènes et des éléments génétiques d'origine procaryote (*B. thuringiensis*, *A. tumefaciens* et *E. coli*) facilitant le transfert de gènes vers des bactéries par amorçage de la recombinaison sur les régions de similarité de séquence. Si de tels événements de transfert n'ont jamais été détectés au champ (Demanèche et al., 2008), ils ont été détectés à des fréquences très basses en laboratoire sur le couple modèle *Acinetobacter* sp./betterave transgénique (Gebhard and Smalla, 1998), et en serre sur le couple modèle *Acinetobacter* sp./tabac transgénique (Kay et al., 2002).

(b) Plant to plant gene transfer

p. 51 :

"These species of teosinte do not occur in Europe and, therefore, gene transfer from MIR604 maize to other sexually compatible plant species is not possible since maize has no wild relatives in the EU (...)"

Le pétitionnaire devrait considérer le cas des DOM-COM dans la question de la distribution géographique et la culture du maïs, incluant la distribution en Europe d'espèces compatibles. Par définition, cette question devrait donc être abordée dans la section B5 du dossier, puis elle devrait être prise en compte dans cette section pour l'évaluation du risque de croisement avec des espèces compatibles.

7. Information on any toxic, allergenic or other harmful effects on human or animal health arising from the GM food/feed

7.3 Selection of material and compounds for analysis

p. 55 :

"Of the components with statistically significant across-location comparisons, only linolenic acid, was significantly different at two locations (...)"

On est dans un cadre de comparaisons multiples et il est attendu d'observer des "faux-positifs" (5 % sous l'hypothèse nulle). Des techniques de type FDR (False Discovery Rate) devraient être employées pour contrôler le taux de faux positifs.

p. 56 :

"Considering the large amount of data, it can be concluded that the results are sufficient to show that there are no biologically relevant differences between the MIR604 plants and their controls."

Cette conclusion ne repose sur aucun critère statistique précis : seule une analyse de puissance permettrait éventuellement d'affirmer qu'une différence biologiquement significative pourrait être détectée avec une grande probabilité étant donné la taille de l'échantillon.

p. 56 :

“These findings support the conclusion that grain and forage from MIR604 maize are compositionally equivalent to conventional maize varieties except for the presence of the newly introduced intended traits.”

Les tests de comparaison ne permettent pas de conclure à l'équivalence : c'est un test d'équivalence qui aurait dû être mis en œuvre pour aboutir à cette conclusion.

7.4 Agronomic traits

En complément aux essais en champ réalisés précédemment aux Etats-Unis, de nouvelles évaluations des caractéristiques agronomiques du maïs MIR604 ont spécifiquement été réalisées pour cette demande d'autorisation de culture en Europe : trois étaient localisées en Espagne, et trois en Roumanie. Toutefois, considérant la possibilité que le MIR604 soit cultivé dans les DOM-COM, le CS du HCB juge que des essais devraient également être réalisés dans ces conditions tropicales, avec une analyse particulière de l'incidence du maïs MIR604 sur l'entomofaune (section 9.5) et de l'impact d'un déséquilibre de pathogènes sur des stratégies futures de protection des cultures (section 9.9).

p. 59 :

“While some differences between MIR604 maize and near-isogenic control were found to be significant at the per location analysis, none of them were occurring in more than one location, (...)”

On est dans un cadre de comparaisons multiples et il est attendu d'observer des “faux-positifs” (5 % sous l'hypothèse nulle). Des techniques de type FDR (False Discovery Rate) devraient être employées pour contrôler le taux de faux positifs.

p. 59 :

“The results of the comparisons between MIR604 maize and the near-isogenic control maize in the EU trials confirm the results obtained in studies previously submitted and confirm the conclusion that the agronomic performance and phenotypic characteristics of MIR604 maize are comparable to the near-isogenic conventional maize...”

Les tests de comparaison ne permettent pas de conclure à l'équivalence : c'est un test d'équivalence qui aurait dû être mis en œuvre pour aboutir à cette conclusion.

7.8 Toxicology

7.8.1. Safety assessment of newly expressed proteins

Annexe 21 p. 28 :

“For environments outside MIR604 maize fields in the EU the main route of exposure to NTOs is through exposure to maize pollen deposited in leaves. However, MIR604 maize pollen contains very small amounts of mCry3A, therefore the levels of exposure to NTOs outside the maize agroecosystem can be considered very low. “

Le pétitionnaire indique que l'impact accidentel sur des organismes non-cibles à l'extérieur des champs serait principalement lié au pollen ; ceci est contradictoire avec les résultats d'analyse d'expression de l'insert, qui montrent que la toxine est présente dans toutes les parties du végétal à l'exception du pollen (p. 40). En revanche, rien n'est dit sur les toxines véhiculées par les résidus de récolte, et notamment celles emportées par les cours d'eau. Il n'est donc pas fait état de l'impact de ces protéines sur des insectes aquatiques. Or, des études comme celles de Jennifer L. Tank et collègues (Tank et al., 2010), montrent que les toxines de Cry1Ab peuvent être présentes dans les cours d'eau à proximité des champs de PGM. L'impact des concentrations de protéine Cry1Ab observées sur les organismes non-cibles n'est pas connu à ce jour et l'étude de Jennifer L. Tank conclut que la question mérite

d'être explorée. La question est transposable au sujet de la toxine mCry3A. Le pétitionnaire pourrait-il évaluer l'impact éventuel de toxines mCry3A sur des insectes aquatiques par accumulation de résidus de récolte dans les cours d'eau ?

7.8.3. Information on natural food and feed constituents

p. 63 :

“Therefore the conclusion was that forage and grain from MIR604 maize are compositionally equivalent to those of conventional maize except for the presence of the newly expressed proteins...”

Les tests de comparaison ne permettent pas de conclure à l'équivalence : c'est un test d'équivalence qui aurait dû être mis en œuvre pour aboutir à cette conclusion.

7.10 Nutritional assessment of GM food/feed

7.10.1 Nutritional assessment of GM food

p. 66 :

“Therefore it can be concluded that MIR604 maize is as nutritionally wholesome and equivalent to conventional maize.”

Les tests de comparaison ne permettent pas de conclure à l'équivalence : c'est un test d'équivalence qui aurait dû être mis en œuvre pour aboutir à cette conclusion.

7.10.2 Nutritional assessment of GM feed

p. 66 :

“Therefore it can be concluded that MIR604 maize is as nutritionally wholesome and equivalent to conventional maize.”

Les tests de comparaison ne permettent pas de conclure à l'équivalence : c'est un test d'équivalence qui aurait dû être mis en œuvre pour aboutir à cette conclusion.

9. Potential changes in the interactions of the GM plant with the biotic environment resulting from the genetic modification

9.1 Persistence and invasiveness

Les caractéristiques de persistance et de capacité d'invasion du maïs MIR604 ont été explorées au cours des essais en champ effectués aux Etats-Unis (dossier EFSA-GMO-UK-2005-11), en Roumanie et en Espagne (Annexe 16 du présent dossier), par la mesure d'une série de caractères *a priori* impliqués dans ces phénomènes, tels que la dispersion des graines. Le pétitionnaire indique que bien que des différences significatives aient été détectées sur certains sites, les données n'indiquent pas de différences qui seraient dues au transgène de façon cohérente entre hybrides et entre sites. Le pétitionnaire conclut alors (p. 67) :

“Therefore the results indicate that MIR604 maize will not be more persistent or invasive than conventional maize.”

Le CS du HCB remarque ici encore que les conclusions obtenues dans des essais en champs réalisés aux Etats-Unis, en Roumanie et en Espagne ne devraient pas être extrapolées à des conditions tropicales qui n'ont pas été testées. Par conséquent, le CS du HCB juge que les caractéristiques de persistance et de capacité d'invasion du maïs MIR604 n'ont pas été évaluées pour les DOM-COM situés en zones tropicales.

9.4 Interactions between the GM plant and target organisms

1. Le pétitionnaire reconnaît que le MIR604 n'est pas un maïs « high-dose », mais plutôt « low-dose ». Il indique à juste titre, dans le cas de PGM « low-dose », la nécessité de mettre en place des zones refuges plus importantes pour limiter les risques de développement de la résistance (Annexe 22 p. 30) :

"Nevertheless, insecticidal traits characterised by lack of high dose expression can still be used for pest insect control if other biological parameters or effects on population dynamics can be shown to prevent the transmission of resistance genes to the subsequent generation. In the absence of these mitigating factors, EPA concedes that effective IRM is still possible although larger refuges may be required (US EPA, 2001)."

Le pétitionnaire n'expose pas clairement les raisons et les données lui permettant de conclure que la mise en place de 20 % de refuge – *i. e.* le taux de refuge recommandé pour les événements Bt11 et MON810, événements "high-dose" vis-à-vis de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* – sera *a priori* suffisante pour limiter durablement l'apparition de résistances.

Le modèle proposé par Syngenta – développé en partenariat avec David Onstad, U. Illinois – est certainement pertinent pour la situation nord américaine, mais il n'est pas adapté à la situation européenne. La rotation maïs-soja et la densité de larves de *Diabrotica virgifera virgifera* par hectare sont deux éléments de divergence. La présence d'individus résistants à la rotation maïs-soja n'est pas démontrée en Europe. Une modélisation ciblée sur les données et le contexte européens permettrait de mieux évaluer la pertinence/efficacité d'une zone refuge de 20 %.

En attendant, dans le modèle proposé, le scénario le plus vraisemblable est certainement le numéro I – *i. e.* la culture de maïs continue sans rotation. Syngenta, dans sa conclusion, indique (Annexe 22 p. 54) :

"The most complicated cases are for areas without rotation-resistance or for farmers who want to protect continuous maize in all areas. The simulations show that resistance to transgenic MIR604 maize may occur in 9-12 years with a 20% refuge, a toxin survival of 0.093 (the overall mean) and with dominant expression of resistance. However, if expression is additive, the evolution of resistance will be delayed 1-2 more years and if, as noted above, the resistance is recessive, then resistance will not evolve within 15 years. If initial allele frequency is higher than expected, evolution can occur a few years earlier. If soil insecticides are used on an annual basis in the refuge, a 20% refuge effectively becomes a 10% refuge when resistance expression is dominant or additive."

Pour ce scénario I, les données qui figurent dans l'Appendix A (Tables and sensitivity analysis to accompany modelling section, Annexe 22 p. 59) indiquent un gain – parfois non négligeable – associé à la mise en place de 30 % de refuge (au lieu de 20 %) lorsque la résistance n'est pas complètement récessive. Comment le pétitionnaire justifie-t-il alors le choix de mettre en place des zones refuges de 20 % plutôt que 30 % des parcelles cultivées ?

2. L'horizon de temps – 15 ans – pour le développement de la résistance n'est pas justifié.
3. Le nombre d'exploitations de moins de 5 ha est limité en Europe. Il faudrait toutefois s'assurer que ces exploitations ne sont pas concentrées dans certaines régions où *Diabrotica virgifera virgifera* est largement implanté. Une telle concentration pourrait conduire à la culture à large échelle et sans refuge de champs transgéniques, une situation propice à une sélection rapide d'allèles de résistance.
4. Il existe plusieurs foyers européens – *i. e.* des foyers qui ont été fondés de manière indépendante à partir des Etats-Unis (Miller et al., 2005). Le pétitionnaire ne mentionne pas ce résultat et n'en tire aucune conséquence en termes de monitoring.

9.5 Interactions of the GM plant with non-target organisms

1. Le pétitionnaire conclut de manière formelle à l'absence de risque pour les organismes non-cibles. Cette conclusion paraît excessive pour deux raisons.

La première est que pour toutes les espèces testées, l'impossibilité de rejeter l'hypothèse nulle – *i. e.* l'hypothèse que les traits d'histoire de vie (survie, vitesse de développement....) ont les mêmes valeurs quel que soit le régime alimentaire (maïs conventionnel *versus* maïs Bt) – ne permet pas de conclure à une absence de risque. Quelques exemples :

- **La coccinelle à sept points** *Coccinella septempunctata* :

Annexe 21 p. 42 :

“Adult mortality was 7.5% in the control population and 15% in the mCry3A-treated population, giving a corrected mortality of 8.1%. This was not statistically significantly different from the control mortality at the 5% level. The development time from larva to pupa was not significantly different between the control and treatment populations. The time from larva to adult was slightly shorter in the treatment population (9.48 compared with 9.80 days in the control group), and this difference was statistically significant at 5%.”

Dans leur article, Raybould *et al.* (2007) ne mentionnent que la différence de temps de développement larvaire des coccinelles à sept points causée par la toxine mCry3A – qui est la seule différence significative – en indiquant que cette différence ne pose pas de problème particulier (Raybould *et al.*, 2007). Ils ne mentionnent pas la différence de mortalité – puisque celle-ci n'est pas significative – alors qu'elle pourrait être problématique si elle est réellement de 8 %.

A noter que dans les essais au champ réalisés en Espagne avec des variétés Bt11 x MIR604 x GA21 (Annexe 38), la lignée isogénique abritait plus de coccinelles à sept points que les variétés transgéniques à l'une des dates d'échantillonnage. Ceci est repris dans l'Annexe 21 (p. 63) :

“Significantly higher numbers of ladybird beetles (larvae and adults) (Coleoptera) were found in the near isogenic line treated with Talstar at one of the sampling dates.”

GA21 n'ayant pas d'activité insecticide, et la toxine Cry1Ab exprimée par Bt11 étant spécifique de certains lépidoptères et non de coléoptères, cet effet serait donc vraisemblablement causé par la toxine mCry3A apportée par le parent MIR604.

Considérant que la culture du maïs MIR604 a potentiellement un effet négatif sur la coccinelle à sept points, le CS du HCB souhaiterait que la fraction de la population de cette espèce de coccinelles se nourrissant de maïs plutôt que d'autres plantes/cultures soit indiquée. Cette donnée permettrait d'apprécier l'impact maximal que ce maïs transgénique pourrait avoir sur cette espèce non-cible.

- **L'abeille** *Apis mellifera* :

Annexe 21 p. 50 :

“In the cells containing larvae at the beginning of the test, there was 6.0% mortality in the control hives and 6.8% mortality in the hives treated with mCry3A microbial test substance; this equated to a corrected mortality of 0.9%, which was not statistically significantly different from zero. Again, 100% mortality was recorded from cells in hives treated with Dimilin Flo.

However, at the end of the test there were fewer cells occupied by brood in the microbial test substance and Dimilin Flo treatments (40.7% and 27.7% respectively) than in the control hives (49.6%). The difference was statistically significant in the case of the Dimilin Flo, but not in the case of mCry3A microbial test substance.”

A nouveau, les différences entre les lots traités avec mCry3A et les lots non-traités étant non-significatives, Raybould *et al.* (2007) et le pétitionnaire concluent à une

absence d'effet de la toxine sur les colonies d'abeille. Or, si le test avait été plus puissant, cette différence aurait pu être significative. La question est de savoir si une baisse de 9 % des cellules occupées par du couvain peut poser un problème biologique. Si la réponse est oui, la puissance des tests aurait dû être ajustée en conséquence.

- **Le ver de terre *Eisenia fetida* :**

Annexe 21 p. 52 :

*“At 7 DAT, there was 0% mortality in the control population and 2.5% mortality in the treatment population. At 14 DAT, mortality in the control population was still 0% and in the treatment population it had risen to 5.0%. The difference between the control and treatment was not statistically significant at either time. During the study the weight of earthworms in the control population decreased by 11.4% and the weight of earthworms in the treatment population decreased by 5.8%; this difference was not significant. Under conditions of the test, mCry3A microbial test substance was not harmful to the earthworm *Eisenia foetida*.”*

Les remarques formulées ci-dessus pour la coccinelle et l'abeille s'appliquent aussi pour le ver de terre.

Il ne s'agit nullement ici de conclure à la présence d'un effet de la toxine mCry3A sur ces espèces non-cibles, mais de pointer le fait qu'il est abusif de conclure à l'absence de risque. Les analyses statistiques devraient tout simplement être accompagnées d'une analyse de puissance. Dans le dossier, cette puissance est, dans certains cas, particulièrement limitée. Par exemple, les effectifs particulièrement bas des tests sur les cailles (Annexe 21 p. 54 : *“The control and treatment groups both comprised five males and five females”*) confère aux tests une puissance statistique relativement limitée, qui laisse peu de chance de rejeter l'hypothèse nulle.

La seconde raison est que l'absence d'effet sur une espèce donnée, notamment pour les espèces appartenant à la famille des Coléoptères dont certaines sont ciblées par la toxine mCry3A, ne permet pas de conclure à l'absence d'effet sur des espèces qui n'ont pas été testées. Le pétitionnaire conclut pourtant (Annexe 21 p. 58) :

“Since under these conditions mCry3A has not shown any adverse effects on representative species that have potentially high sensitivity and exposure, there is high confidence of minimal risk of the MIR604 maize to all non-target organisms (US-EPA, 2006; CFIA, 2007; Raybould et al., 2007; US-EPA, 2007)”

ou encore que (Annexe 21 p. 59) :

“Since the NTO species tested in Tier I laboratory studies are representative of main functional groups potentially present in maize fields and the insect species tested are taxonomically related to WCRW (and therefore more at risk), the results obtained show with high confidence that cultivation of MIR604 maize is unlikely to result in adverse effects on NTOs present in maize fields.”

Les conclusions finales sont encore plus radicales. Le pétitionnaire affirme en effet (Annexe 21 p. 62) :

“The cultivation of MIR604 maize will not result in harmful effects on populations of NTOs that play an important function on maize agroecosystems.”

“The cultivation of MIR604 maize will not result in harmful effects on populations of NTOs in environments surrounding fields planted with this maize.”

“The cultivation of MIR604 maize will not result in adverse effects on biodiversity.”

Si le CS du HCB s'accorde sur le fait que l'impact sur l'entomofaune non-cible est certainement limité, il semble hasardeux de conclure à une absence totale d'impact sur l'ensemble de l'entomofaune non-cible. Le CS du HCB demande donc à ce que les conclusions soient relativisées et nuancées selon ce que les résultats de l'analyse statistique (ampleur des effets, significativité et analyse de puissance) permettent réellement d'affirmer.

2. Les essais en champ destinés à analyser l'impact sur l'entomofaune non-cible sont réalisés avec des lignées de maïs Bt11 x MIR604 x GA21, et non du maïs MIR604 (Annexes 38 et 39). Ce dossier étant une demande d'autorisation de culture du maïs MIR604 en Europe, il serait attendu que le maïs MIR604 lui-même soit testé.
3. Les essais en champ destinés à analyser l'impact sur l'entomofaune non-cible en Europe sont réalisés en Espagne et en Roumanie (Annexes 38 et 39). Le HCB considère que les résultats de ces essais ne peuvent être extrapolés à l'entomofaune présente dans les DOM-COM des régions tropicales, telles que les Antilles françaises ou la Guyane française. De même, le pétitionnaire devrait s'assurer d'inclure des membres représentatifs de l'entomofaune des régions tropicales pour les tests de toxicité de mCry3A en laboratoire.

9.9 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

1. Le pétitionnaire devrait considérer la culture en conditions tropicales, où les pratiques agricoles pourraient être différentes de celles appliquées en Europe « continentale ».
2. Les pratiques de culture classiques prévues pour le MIR604, comme l'usage d'insecticides et la rotation des cultures, sont peu explicitées. De quels insecticides s'agit-il ? Contre quels ravageurs ?

11. Environmental Monitoring Plan

11.1 General

Le CS du HCB rappelle au notifiant qu'il sera de son devoir, comme prévu par la loi n°2008-595 du 25 juin 2008 relative aux organismes génétiquement modifiés (NOR : DEVX0771876L), d'apporter son concours, quand celui-ci sera sollicité, au Comité de surveillance biologique du territoire (CSBT, Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008 relatif à la création du comité de surveillance biologique du territoire mentionné à l'article L. 251-1 du code rural), pour la surveillance liée à l'utilisation des biotechnologies qu'il commercialiserait en France. Cette surveillance concerne les effets immédiats mais aussi différés que pourraient présenter la technologie MIR604. Il se pourrait donc que la durée de surveillance préconisée par le CSBT ou le HCB, après examen des rapports annuels, se prolonge si nécessaire au-delà de la durée de l'autorisation accordée.

11.2 Interplay between environmental risk assessment and monitoring

En matière d'impact sur la biodiversité, le CS du HCB prend acte du fait qu'aucun effet immédiat du maïs MIR604 sur l'éventail des espèces testées n'a été détecté. Il souligne cependant que la seule possibilité de mettre en évidence les effets différés se traduisant par une augmentation ou une réduction significative des populations d'organismes non-cibles est la mise en place d'un suivi sur plusieurs années de ces organismes dans le cadre d'un plan de biosurveillance générale. Ce suivi devra s'attacher à choisir des espèces pertinentes à suivre en fonction des zones géographiques considérées et à définir l'échelle d'observation. Il est rappelé au pétitionnaire que celui-ci devra se mettre en lien avec le Comité de surveillance biologique du territoire (CSBT) en France pour mettre en place la biosurveillance générale.

11.4 General surveillance for unanticipated adverse effects

1. Le CS du HCB demande à ce que soit précisée la fréquence des interventions des experts mandatés par le notifiant dans les processus de surveillance et de conseil auprès des utilisateurs.
2. Le CS du HCB demande que l'éventail des réseaux de biosurveillance qui seront sollicités et qui sont indiqués très globalement dans le dossier soit mieux décrit. Outre des réseaux commerciaux, d'autres types de réseaux sont-ils envisagés (réseaux épidémiologique-surveillance existants ou associations (ONG) reconnues etc.) ?

3. Le CS du HCB a pris bonne note de la méthodologie statistique reconnue scientifiquement (Schmidt et al., 2006) choisie par l'opérateur. Il lui demande cependant de vérifier si l'approche choisie s'inscrit dans les règles d'analyse statistique proposées par l'AESA (EFSA, 2010), et d'actualiser, le cas échéant, l'analyse des données recueillies et des traitements statistiques des plans de surveillance générale et spécifique à la lumière de ces nouvelles règles d'analyse statistique.

3. Bibliographie

Carroll, J., Convents, D., VanDamme, J., Boets, A., VanRie, J., and Ellar, D.J. (1997). Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J Invertebr Pathol* *70*, 41-49.

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3957-3962.

EC (2003). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union L268*, 1-23.

EC (2009). Commission Decision of 30 November 2009 authorising the placing on the market of products containing, consisting of, or produced from genetically modified maize MIR604 (SYN-IR6Ø4-5) pursuant to Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union L314*, 102-105.

EFSA (2006). 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* *99*, 1-100.

EFSA (2010). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA, question n° EFSA-Q-2006-080. *The EFSA Journal* *8(1):1250*, pp. 59.

Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., and Jurat-Fuentes, J.L. (2009). A Novel *Tenebrio molitor* Cadherin Is a Functional Receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Toxin. *J Biol Chem* *284*, 18401-18410.

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* *64*, 1550-1554.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* *68*, 3345-3351.

Miller, N., Estoup, A., Toepfer, S., Bourguet, D., Lapchin, L., Derridj, S., Kim, K.S., Reynaud, P., Furlan, L., and Guillemaud, T. (2005). Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* *310*, 992.

Park, Y., Abdullah, M.A.F., Taylor, M.D., Rahman, K., and Adang, M.J. (2009). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb Toxicities to Coleopteran Larvae by a Toxin-Binding Fragment of an Insect Cadherin. *Appl Environ Microbiol* *75*, 3086-3092.

Raybould, A., Stacey, D., Vlachos, D., Graser, G., Li, X., and Joseph, R. (2007). Non-target organism risk assessment of MIR604 maize expressing mCry3A for control of corn rootworm. *J Appl Entomol* *131*, 391-399.

Schmidt, K., Beißner, L., Schiemann, J., and Wilhelm, R. (2006). Methodology and tools for data acquisition and statistical analysis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 21-25.

Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Royer, T.V., Whiles, M.R., Griffiths, N.A., Frauendorf, T.C., and Treering, D.J. (2010). Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17645-17650.

Walters, F.S., Stacy, C.M., Lee, M.K., Palekar, N., and Chen, J.S. (2008). An engineered chymotrypsin/cathepsin site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae. *Appl Environ Microbiol* 74, 367-374.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE, DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la production primaire

Sous direction de la
qualité et de la protection
des végétaux

Bureau de la
biovigilance, des
biotechnologies et de la
qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame BRECHIGNAC
Présidente du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

4 FEV. 2011

Paris, le

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Références : 110126-saisine HCB- dossier 2010-83

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Madame la Présidente,

Dans le cadre du règlement 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'AESA, le dossier est mis à disposition des États membres qui disposent de 3 mois pour faire des commentaires.

Le dossier suivant a été déclaré valide par l'AESA et est soumis à consultation des États membres :

- dossier **EFSA-GMO-UK-2010-83**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **MIR604** pour la culture.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'AESA jusqu'au 21 avril 2011.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de rendre un avis au plus tard **le 18 avril 2011**.

Je vous prie de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de ma considération distinguée.

L'Ingénieur en chef des Ponts,
des Eaux et des Forêts
Sous-Directeur
de la Qualité et de la Production des Végétaux

Robert TESSIER

Annexe 2 : Elaboration des commentaires

Ces commentaires ont été élaborés par le CS du HCB, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président, Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

et par ordre alphabétique des noms de famille : Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Nicolas Ferry, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Stéphane Lemarié, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Participant à l'élaboration de l'avis de l'AESA en tant que membre du panel OGM de l'AESA, Antoine Messéan n'a contribué ni à l'élaboration ni à la rédaction de ces commentaires.

Aucun des autres membres du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec sa réponse à la consultation.

Annexe 3 : Commentaires traduits en anglais à destination de l'AESA

Cette annexe est une compilation des commentaires du HCB sur le dossier EFSA-GMO-UK-2010-83 traduits en anglais à destination de l'AESA, prêts à être postés en ligne de manière indépendante par section dans les formulaires du site de l'AESA.

A3.1. General comments

1. As a whole, EFSA-GMO-UK-2010-83 notification for MIR604 maize cultivation in Europe only refers to cropping regions in temperate climate zones. The notifier should systematically consider in his risk assessment analysis that maize may also be cultivated in parts of the European Union that are located in tropical regions. It is the case for some of the French overseas territories like the French Antilles (French West Indies).
2. Comparison tests are properly conducted, with the use of statistical mixed models when random effects must be differentiated from fixed effects. However, comparison tests only are performed to determine whether the differences observed are statistically significant. Neither power analysis nor equivalence testing is proposed. The multiplicity of the statistical tests is not taken into account either. EFSA guidelines, which stated these principles for compositional analysis (EFSA, 2010), are incorrectly implemented.

EFSA (2010). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA, question n° EFSA-Q-2006-080. The EFSA Journal *8(1):1250*, pp. 59.

A3.2. Comments per section

B. INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL PLANTS

2. (b) Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species

The Scientific committee of the High Council for biotechnologies acknowledges that no species cross-compatible with maize exist in "continental" Europe. However, the notification should consider the potential existence of species able to hybridize with maize in French overseas territories, such as the French Antilles (French West Indies) or French Guiana.

3. Survivability (b) specific factors if any affecting survivability

The notifier should specify the range of environmental conditions required for maize survival, keeping in mind that maize can be cultivated under the tropical conditions found in some French overseas territories like the French Antilles (French West Indies).

5. Geographical distribution and cultivation of the plant, including the distribution in Europe of the compatible species

This section should consider the possibility for maize cultivation and for the existence of species cross-compatible with maize in some French overseas territories, in particular in the French Antilles (French West Indies).

D. INFORMATION RELATING TO THE GM PLANT

6. Any change to the ability of the GM plant to transfer genetic material to other organisms

(a) Plant to bacteria gene transfer

The Scientific Committee of the High Council for biotechnologies estimates that the probability for plant to bacteria gene transfer is very low, and that if such an event happened, its impact on the environment and on human and animal health would be negligible. However, the notifier's statement (p. 50):

"In conclusion, no change in the ability of MIR604 maize to transfer genetic material to other organisms is observed when compared to conventional maize."

is incorrect, considering that the genetic insert in MIR604 contains genes and genetic elements of prokaryotic origin (*B. thuringiensis*, *A. tumefaciens* et *E. coli*), which facilitates gene transfer to bacteria by priming recombination through sequence homologous regions. Such plant to bacteria gene transfer events have never been detected in the field (Demanèche et al., 2008). However, they have been detected at very low frequency in the laboratory on the model system *Acinetobacter* sp./transgenic sugarbeet (Gebhard and Smalla, 1998), and in the glasshouse on the model system *Acinetobacter* sp./transgenic tobacco (Kay et al., 2002).

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3957-3962.

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 1550-1554.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68, 3345-3351.

(b) Plant to plant gene transfer

p. 51:

"These species of teosinte do not occur in Europe and, therefore, gene transfer from MIR604 maize to other sexually compatible plant species is not possible since maize has no wild relatives in the EU (...)"

European Member State Overseas Territories should be considered in the question of geographical distribution and cultivation of the plant and distribution of potential compatible species in Europe. By definition, this issue should be first dealt with in section B5 of the notification, and taken into account in this section (D6) for the assessment of plant-to-plant gene transfer.

7. Information on any toxic, allergenic or other harmful effects on human or animal health arising from the GM food/feed

7.3 Selection of material and compounds for analysis

p. 55:

"Of the components with statistically significant across-location comparisons, only linolenic acid, was significantly different at two locations (...)"

False-positive results are expected in multiple comparisons (5% under the null hypothesis). FDR (False discovery rate) techniques should be used to control the expected proportion of incorrectly rejected null hypotheses.

p. 56:

“Considering the large amount of data, it can be concluded that the results are sufficient to show that there are no biologically relevant differences between the MIR604 plants and their controls.”

This conclusion relies on no specific statistical criteria. A power analysis is required to assess the probability of detection of biologically relevant differences for a given sample size.

p. 56:

“These findings support the conclusion that grain and forage from MIR604 maize are compositionally equivalent to conventional maize varieties except for the presence of the newly introduced intended traits.”

The comparison tests presented in the notification do not permit to conclude on compositional equivalence. Any conclusion about compositional equivalence should be based on equivalence tests.

7.4 Agronomic traits

In addition to the field trials previously conducted in the USA, agronomic traits of MIR604 maize have been assessed in six locations in Europe: in Spain, Czech republic and Romania. However, considering the possibility that MIR604 could be grown in French overseas territories like the French Antilles, trials should be extended to such more tropical conditions. Particular attention should be paid on MIR604 impact on local entomofauna (section 9.5), and on the consequences of the induced pests imbalance on future crop protection strategies (section 9.9).

p. 59:

“While some differences between MIR604 maize and near-isogenic control were found to be significant at the per location analysis, none of them were occurring in more than one location,(...)”

False-positive results are expected in multiple comparisons (5% under the null hypothesis). FDR (False discovery rate) techniques should be used to control the expected proportion of incorrectly rejected null hypotheses.

p. 59:

“The results of the comparisons between MIR604 maize and the near-isogenic control maize in the EU trials confirm the results obtained in studies previously submitted and confirm the conclusion that the agronomic performance and phenotypic characteristics of MIR604 maize are comparable to the near-isogenic conventional maize...”

The comparison tests presented in the notification do not permit to conclude on compositional equivalence. Any conclusion about compositional equivalence should be based on equivalence tests.

7.8 Toxicology

7.8.1. Safety assessment of newly expressed proteins

Annexe 21 p. 28:

“For environments outside MIR604 maize fields in the EU the main route of exposure to NTOs is through exposure to maize pollen deposited in leaves. However, MIR604 maize pollen contains very small amounts of mCry3A, therefore the levels of exposure to NTOs outside the maize agroecosystem can be considered very low. “

The notifier indicates that the main route of exposure to non-target organisms outside MIR604 maize fields would be through exposure to maize pollen deposited in leaves. This is inconsistent with the results from expression analyses, which show that mCry3A is detected in all maize tissues except pollen (p. 40). On the contrary, nothing is said about the potential impact of the toxins present in maize detritus, in particular of those toxins ending up in stream ecosystems. Yet, studies like that of Jennifer L. Tank and colleagues (Tank et al., 2010) show that Cry1Ab toxins are present in streams that drain agricultural fields in proximity of GM crops. The impact of the observed concentrations of Cry1Ab on non-target organisms is not known, and J.L. Tank's paper concludes that the question merits further study. The issue can be transposed to mCry3A. Could the notifier assess the potential impact of mCry3A toxins on aquatic insects by accumulation of detritus in water streams?

Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Royer, T.V., Whiles, M.R., Griffiths, N.A., Frauendorf, T.C., and Treering, D.J. (2010). Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17645-17650.

7.8.3. Information on natural food and feed constituents

p. 63:

"Therefore the conclusion was that forage and grain from MIR604 maize are compositionally equivalent to those of conventional maize except for the presence of the newly expressed proteins..."

The comparison tests presented in the notification do not permit to conclude on compositional equivalence. Any conclusion about compositional equivalence should be based on equivalence tests.

7.10 Nutritional assessment of GM food/feed

7.10.1 Nutritional assessment of GM food

p. 66:

"Therefore it can be concluded that MIR604 maize is as nutritionally wholesome and equivalent to conventional maize."

The comparison tests presented in the notification do not permit to conclude on compositional equivalence. Any conclusion about compositional equivalence should be based on equivalence tests.

7.10.2 Nutritional assessment of GM feed

p. 66:

"Therefore it can be concluded that MIR604 maize is as nutritionally wholesome and equivalent to conventional maize."

The comparison tests presented in the notification do not permit to conclude on compositional equivalence. Any conclusion about compositional equivalence should be based on equivalence tests.

9. Potential changes in the interactions of the GM plant with the biotic environment resulting from the genetic modification

9.1 Persistence and invasiveness

Persistence and invasiveness of MIR604 maize were assessed in field trials in the USA (notification EFSA-GMO-UK-2005-11), and in Romania and Spain (this notification, Appendix

16), by the measurement of a series of traits that might affect the ability of maize to survive without human intervention, such as seed dispersal. The notifier indicates that although statistically significant differences were detected in some locations, no consistent trends across locations or hybrids could support that these differences were due to the transgene. The notifier then concludes (p. 67):

“Therefore the results indicate that MIR604 maize will not be more persistent or invasive than conventional maize.”

The Scientific committee of the High Council for biotechnologies notes again that the conclusions obtained from field trials in the USA, Romania and Spain, cannot be extrapolated to conditions that have not been tested, such as tropical conditions. Hence, the SC of HCB considers that persistence and invasiveness of MIR604 maize have not been assessed for the Overseas Territories located in tropical zones, such as the French Antilles (French West Indies).

9.4 Interactions between the GM plant and target organisms

1. The notifier acknowledges that MIR604 maize is a low-dose rather than a high-dose event. He rightly indicates that low-dose GMP require larger refuges to mitigate the risks for the development of resistance (Appendix 22 p. 30):

“Nevertheless, insecticidal traits characterised by lack of high dose expression can still be used for pest insect control if other biological parameters or effects on population dynamics can be shown to prevent the transmission of resistance genes to the subsequent generation. In the absence of these mitigating factors, EPA concedes that effective IRM is still possible although larger refuges may be required (US EPA, 2001).”

However, the notifier does not clearly expose the data and the rationale supporting his conclusion that refuge zones of only 20% of MIR604 maize crop area – corresponding to the same refuge level as that recommended for high-dose events like Bt11 and MON810 resistant against *Ostrinia nubilalis* – will be *a priori* sufficient to mitigate the risk for the selection of resistance in the long term.

The model proposed by Syngenta – developed in collaboration with David Onstad, U. Illinois – may be relevant for North America, but is not suitable for Europe for two reasons: the soybean-maize rotation, and the density of *Diabrotica virgifera virgifera* larvae per hectare. The presence of individuals of *Diabrotica* resistant to the soybean-maize rotation has not been shown in Europe. To assess the relevance and efficacy of refuge levels of 20% in Europe, models should be developed using European data.

In the meantime, the best-suited scenario for Europe in the proposed model would be scenario I, which consists in 100% continuous maize fields in the landscape without rotation. Syngenta concludes for this scenario (Appendix 22 p. 54):

“The most complicated cases are for areas without rotation-resistance or for farmers who want to protect continuous maize in all areas. The simulations show that resistance to transgenic MIR604 maize may occur in 9-12 years with a 20% refuge, a toxin survival of 0.093 (the overall mean) and with dominant expression of resistance. However, if expression is additive, the evolution of resistance will be delayed 1-2 more years and if, as noted above, the resistance is recessive, then resistance will not evolve within 15 years. If initial allele frequency is higher than expected, evolution can occur a few years earlier. If soil insecticides are used on an annual basis in the refuge, a 20% refuge effectively becomes a 10% refuge when resistance expression is dominant or additive.”

Data for this scenario (Tables and sensitivity analysis to accompany modelling section, Appendix A in Appendix 22 p. 59) show that refuge levels of 30% further delay the evolution of resistance compared to refuge levels of 20% when the resistance is not fully recessive. How then does the notifier justify the choice for refuge levels of 20% rather than 30%?

2. The time horizon of 15 years for the development of resistance after introduction of MIR604 maize is not justified.
3. Refuge rules apply only to plots larger than 5 ha. Although the number of plots under 5 ha is limited in Europe, their potential concentration in regions infested with *Diabrotica virgifera virgifera* should be checked. Such a concentration could lead to cultivation on a large scale without refuge zones, which would favour the rapid selection of resistance alleles in regions infested with *Diabrotica virgifera virgifera*.
4. There are several outbreaks of western corn rootworm in Europe. These outbreaks were shown to originate from several independent introductions from North America (Miller et al., 2005). The notifier does not mention this fact, neither does he draw any conclusions from it in terms of monitoring.

Miller, N., Estoup, A., Toepfer, S., Bourguet, D., Lapchin, L., Derridj, S., Kim, K.S., Reynaud, P., Furlan, L., and Guillemaud, T. (2005). Multiple transatlantic introductions of the western corn rootworm. *Science* 310, 992.

9.5 Interactions of the GM plant with non-target organisms

1. The notifier concludes from this analysis that MIR604 cultivation will not result in harmful effects on populations of non-target organisms (NTO). Such a clear-cut conclusion on an absence of risks is excessive for the two following reasons.

First, the impossibility to reject the null hypothesis – *i. e.* the hypothesis that life history traits (survival, development rate...) remain unchanged whether fed with conventional maize or Bt maize) – for all the species assessed should not permit the notifier to conclude that there is no risk.

A few examples:

- **The seven spotted ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae)**

Appendix 21 p. 42:

“Adult mortality was 7.5% in the control population and 15% in the mCry3A-treated population, giving a corrected mortality of 8.1%. This was not statistically significantly different from the control mortality at the 5% level. The development time from larva to pupa was not significantly different between the control and treatment populations. The time from larva to adult was slightly shorter in the treatment population (9.48 compared with 9.80 days in the control group), and this difference was statistically significant at 5%.”

In their paper on the assessment of the risk to NTO of MIR604 maize, Raybould and colleagues (2007) only report statistically significant differences between the mCry3A treatment and the negative control groups. In the case of the ladybird study, the only statistically significant difference found was the time to adult emergence, which as such was dismissed as an adverse effect (Raybould et al., 2007). The paper does not discuss differences in mortality (mentioned in the above quote from the notification) because it was not statistically significant, whereas a level of 8% mortality may be considered biologically relevant.

It is worth noting that in the field trials conducted in Spain with varieties Bt11 x MIR604 x GA21 (Appendix 38), the non-GM near-isogenic line hosted more seven spotted ladybirds than the transgenic varieties at one of the sampling dates. This is reported in Appendix 21 as follows (p. 63):

“Significantly higher numbers of ladybird beetles (larvae and adults) (Coleoptera) were found in the near isogenic line treated with Talstar at one of the sampling dates.”

Since GA21 has no insecticidal activity and since the Cry1Ab toxin expressed by Bt11 is specific of some Lepidoptera and not of Coleoptera, this effect is most certainly due to the mCry3A toxin brought by the MIR604 parent.

Considering that MIR604 maize may have a negative effect on the seven spotted ladybird, the Scientific committee of HCB would like to be informed of the fraction of the population of that species of ladybirds that feeds on maize rather than on other plants / crops. This data could allow a better appreciation of the maximal effect of MIR604 maize on this non-target organism.

- **The honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

Appendix 21 p. 50:

“In the cells containing larvae at the beginning of the test, there was 6.0% mortality in the control hives and 6.8% mortality in the hives treated with mCry3A microbial test substance; this equated to a corrected mortality of 0.9%, which was not statistically significantly different from zero. Again, 100% mortality was recorded from cells in hives treated with Dimilin Flo.

However, at the end of the test there were fewer cells occupied by brood in the microbial test substance and Dimilin Flo treatments (40.7% and 27.7% respectively) than in the control hives (49.6%). The difference was statistically significant in the case of the Dimilin Flo, but not in the case of mCry3A microbial test substance.”

Here again, the differences between the hives treated with mCry3A and the non-treated control hives being not statistically significant, Raybould and colleagues (2007) and the notifier conclude that the toxin has no effect on honeybee hives. Yet, if the test had been more powerful, the difference could have been statistically significant. The question is to determine whether a drop of 9% of the cells occupied by brood is biologically relevant. The power of the test should be adapted accordingly.

- **The earthworm *Eisenia fetida* :**

Appendix 21 p. 52:

*“At 7 DAT, there was 0% mortality in the control population and 2.5% mortality in the treatment population. At 14 DAT, mortality in the control population was still 0% and in the treatment population it had risen to 5.0%. The difference between the control and treatment was not statistically significant at either time. During the study the weight of earthworms in the control population decreased by 11.4% and the weight of earthworms in the treatment population decreased by 5.8%; this difference was not significant. Under conditions of the test, mCry3A microbial test substance was not harmful to the earthworm *Eisenia foetida*.”*

The comments formulated above for the ladybird and the honeybee also apply for the earthworm.

The SC of HCB is not for pushing to conclude that there is a real effect of the mCry3A toxin on these non-target organisms, but it wishes to highlight that it is abusive to conclude that there is no risk. Statistical analyses should always be accompanied by power analyses. In the notification, the power of some tests is particularly limited. This is the case for the tests on quails for example (Appendix 21 p. 54: *“The control and treatment groups both comprised five males and five females”*), whose power gives little chance to reject the null hypothesis.

The second reason is that the fact that no risk has been identified on a given species, especially for species of the Coleoptera family of which some are targeted by mCry3A, should not permit to conclude that there is no risk on species that have not been tested. Yet, the notifier concludes (Appendix 21 p. 58):

“Since under these conditions mCry3A has not shown any adverse effects on representative species that have potentially high sensitivity and exposure, there is high confidence of minimal risk of the MIR604 maize to all non-target organisms (US-EPA, 2006; CFIA, 2007; Raybould et al., 2007; US-EPA, 2007)”

or also (Annexe 21 p. 59):

“Since the NTO species tested in Tier I laboratory studies are representative of main functional groups potentially present in maize fields and the insect species tested are taxonomically related to WCRW (and therefore more at risk), the results obtained show with high confidence that cultivation of MIR604 maize is unlikely to result in adverse effects on NTOs present in maize fields.”

The final conclusions are even more radical. The notifier states (Annexe 21 p. 62):

“The cultivation of MIR604 maize will not result in harmful effects on populations of NTOs that play an important function on maize agroecosystems.”

“The cultivation of MIR604 maize will not result in harmful effects on populations of NTOs in environments surrounding fields planted with this maize.”

“The cultivation of MIR604 maize will not result in adverse effects on biodiversity.”

The SC of HCB agrees that the impact of MIR604 maize on non-target entomofauna is probably limited, however it seems excessive to conclude on a total absence of impact on the entire non-target entomofauna. The SC of HCB demands that these conclusions be nuanced according to what the statistical analysis (size of the effects, significance, power analysis, etc) enables to determine with certainty.

Raybould, A., Stacey, D., Vlachos, D., Graser, G., Li, X., and Joseph, R. (2007). Non-target organism risk assessment of MIR604 maize expressing mCry3A for control of corn rootworm. *J Appl Entomol* 131, 391-399.

2. Field trials intended to assess the effects of MIR604 on non-target entomofauna are conducted with varieties of Bt11 x MIR604 x GA21 instead of MIR604 (Appendix 38 and 39). This notification is a request for authorisation of cultivation of MIR604 maize in Europe, therefore it is expected that MIR604 maize be assessed itself.
3. Field trials intended to assess the effects of MIR604 maize on non-target entomofauna in Europe are conducted in Spain and Romania (Appendix 38 and 39). The SC of HCB considers that the results of these trials cannot be extrapolated to the entomofauna of Overseas territories in tropical regions; such as the French Antilles (French West Indies) or the French Guiana. Furthermore, the notifier should make sure to include representatives of entomofauna from these tropical regions for mCry3A toxicity tests in the laboratory.

9.9 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

1. The notifier should consider cultivation in tropical conditions, where specific cultivation, management and harvest techniques may be different from those applied in “continental” Europe.
2. The classical cultivation techniques planned for MIR604, such as the use of insecticides or crop rotation, could be more explicit. What insecticides are anticipated to be used? Against what pests?

11. Environmental Monitoring Plan

11.1 General

The notifier will have to comply with the specific monitoring recommendations of every Member State. In France, the notifier shall assist the Comité de surveillance biologique du territoire (French biosurveillance committee), upon solicitation, for the monitoring of MIR604 maize, as provided by the law n°2008-595 of 25 June 2008 relative to GMO. This monitoring concerns immediate but also delayed effects of MIR604. Therefore, it is possible that the

duration of monitoring recommended by the CSBT or by HCB upon analysis of the notifier's annual reports extends beyond the duration of the authorisation of cultivation.

11.2 Interplay between environmental risk assessment and monitoring

With respect to effect on biodiversity, the SC of HCB acknowledges that no immediate effect of MIR604 maize has been detected on the range of species that were tested. Nevertheless, it emphasizes that the only way to detect delayed effects on non-target populations is to set up a monitoring plan of several years in the context of general surveillance. This plan should choose relevant species to monitor depending on the geographical zones considered and should define the scale of observation. The notifier is reminded that he will have to contact the Comité de surveillance biologique du territoire (French biosurveillance committee) in France to set up the general surveillance plan.

11.4 General surveillance for unanticipated adverse effects

1. The SC of HCB demands more precision regarding the frequency of intervention by the experts mandated by the notifier for surveillance and advice to users.
2. The SC of HCB demands that the monitoring networks that will be solicited by the notifier be described with more precision. Does the notifier intend to solicit other networks than the commercial networks, such as existing networks for monitoring epidemics, well-known NGOs, etc)?
3. The SC of HCB notes that the notifier chose a scientifically recognized statistical methodology (Schmidt et al., 2006). The SC demands however, that the methodology be checked against the latest guidelines for statistical analysis from EFSA (EFSA, 2010), and be updated accordingly.

EFSA (2010). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA, question n° EFSA-Q-2006-080. The EFSA Journal *8(1):1250*, pp. 59.

Schmidt, K., Beißner, L., Schiemann, J., and Wilhelm, R. (2006). Methodology and tools for data acquisition and statistical analysis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* *1*, 21-25.