

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 septembre 2021

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, du maïs génétiquement modifié DP915635-4 développé pour être résistant à certains insectes (chrysomèles, ravageurs des racines) et tolérant au glufosinate-ammonium pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-172)

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 23 juin 2021 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, du maïs génétiquement modifié DP915635-4 développé pour être résistant à certains insectes (chrysomèles, ravageurs des racines) et tolérant au glufosinate-ammonium pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-172).

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/European Food Safety Authority (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° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

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 réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 8 juillet et 26 août 2021 sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides de l'EFSA (2019a) et du Panel GMO de l'EFSA (2006 et 2011) ainsi que 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 publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

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. En 2019 (FAOStat¹), les dix premiers pays producteurs étaient les USA, la Chine, le Brésil, l'Argentine, l'Ukraine, l'Indonésie, l'Inde, le Mexique, la Roumanie et la Russie, qui représentaient environ 80 % de la production mondiale. Cette production était de 1 148 487 291 tonnes pour une surface cultivée de 197 204 250 hectares (dont 70 092 950 tonnes pour une surface cultivée de 8 917 080 hectares dans l'Union européenne, FAOStat¹) dont 31 % du maïs cultivé était génétiquement modifié (ISAAA², 2019).

Les plantes de maïs sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien à maturité pour une utilisation des grains mûrs 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 essentiels, la lysine et le tryptophane, est faible. Le grain de maïs contient des substances antinutritionnelles (acide phytique, DIMBOA³, inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine, raffinose).

Le maïs DP915635-4 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *mo-pat*, *ipd079Ea*, et *pmi* codant respectivement :

- une phosphinotricine N-acétyltransférase (protéine PAT). Elle confère à la plante la tolérance au glufosinate-ammonium en l'acétylant en N-acétyl L-glufosinate (NAG), métabolite non phytotoxique ;

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

² International service for the acquisition of agri-biotech applications

³ 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one

- une protéine insecticide (protéine IPD079Ea). Suite à son ingestion, elle endommage l'épithélium intestinal des larves de certains insectes conduisant ainsi à leur mort,
- une phosphomannose isomérase (protéine PMI). Elle catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Cette enzyme est utilisée comme marqueur d'auxotrophie, permettant de sélectionner les cellules de maïs transformées pour leur capacité à utiliser le mannose comme seule source de carbone.

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 du maïs DP915635-4. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce maïs venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

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 variété de maïs (*Zea mays*) non transgénique PHR03.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique du maïs par la méthode brevetée SSI (site-specific integration) en 2018 comporte deux grandes étapes successives : la création d'un site d'intégration spécifique situé dans un locus précis du génome de maïs puis l'insertion de cassettes d'expression d'intérêt dans ce nouveau site. Après chaque étape de transformation, les séquences insérées présentes dans le génome du maïs ont été caractérisées par séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing) selon la technologie SbS (Southern-by-Sequencing) afin de s'assurer de l'identité des séquences avec les séquences attendues et de l'absence de séquences plasmidiques non désirées.

La **première transformation génétique** a été faite par bombardement de microprojectiles sur des tissus de maïs dans le but d'introduire quatre plasmides : PHP73878, PHP70605, PHP21139 et PHP21875.

Le plasmide PHP73878 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de réplication et séquences nécessaires à la construction du plasmide) et
- entre les bordures droite et gauche d'un ADN-T, **la cassette du site d'intégration spécifique** :
 - o les séquences zm-SEQ158 et zm-SEQ159 qui encadrent la cassette, séquences de maïs permettant la recombinaison homologue médiée par le système CRISPR/Cas9 et conduisant à l'insertion du site d'intégration spécifique ;
 - o un site *loxP*, site de recombinaison du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinaison Cre ;
 - o le promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et ses séquences régulatrices ;
 - o le site FRT1, cible de recombinaison pour la recombinaison FLP de *Saccharomyces cerevisiae* ;
 - o le gène de la néomycine phosphotransférase II (gène *nptII*) du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* ;
 - o le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum*,

- le site FRT6, cible de recombinaison pour la recombinaison FLP de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le plasmide PHP70605 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de répllication et séquences nécessaires à la construction du plasmide) et
- **les éléments utiles pour la recombinaison par nucléase dirigée et non destinés à une insertion dans le génome du maïs :**
 - le promoteur T3 ;
 - le promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et ses séquences régulatrices ;
 - le signal d'adressage vers le noyau du virus simien 40 (SV40 NLS) ;
 - l'exon 1 du gène de l'endonucléase Cas9 ;
 - l'intron du gène *LS1* de *Solanum tuberosum* ;
 - l'exon 2 du gène de l'endonucléase Cas9 ;
 - le signal d'adressage vers le noyau du gène de virulence *virD2* d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
 - le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum* ;
 - la région promotrice du gène de maïs *zm-U6 polIII* CHR8 ;
 - l'ARN guide pour diriger l'endonucléase Cas9 pour une localisation ciblée, *zm-45CR1*,
 - la séquence terminatrice du gène de maïs *zm-U6 polIII* CHR8.

La cassette d'expression présente dans le plasmide PHP21139 contient la séquence codante du gène *Wuschel 2* de maïs (*zm-wus2*). La protéine WUS2 améliorerait la régénération tissulaire.

La cassette d'expression présente dans le plasmide PHP21875 contient la séquence codante du gène *zm-odp2* (ovule development protein 2) de maïs. La protéine ODP2 améliorerait la régénération des plantes cultivées *in vitro*.

Contrairement au plasmide PHP73878 contenant les séquences du site d'intégration spécifique, les séquences des 3 autres plasmides (PHP70605, PHP21139 et PHP21875) ne sont pas destinées à s'intégrer dans le génome du maïs. Le plasmide PHP70605 porte la séquence du CRISPR⁴ ARN guide et les séquences codantes de l'endonucléase Cas9⁵, et les plasmides PHP21139 et PHP21875 portent chacun la séquence codant une protéine qui a un rôle dans la régénération des plantes. L'expression transitoire des trois gènes portés par ces trois derniers plasmides (*Cas9*, *zm-wus2* et *zm-odp2*) et de l'ARN guide *zm-45CR1* a conduit à l'insertion du site d'intégration spécifique dans le génome du maïs et à la régénération de plantes transformées.

Suite à l'entrée des quatre plasmides dans les cellules de maïs grâce au bombardement de microprojectiles, l'ARN guide *zm-45CR1* synthétisé s'est fixé au niveau des séquences cibles *zm-SEQ158* et *zm-SEQ159* localisées sur le chromosome 1 du maïs et a guidé l'endonucléase Cas9. Cette dernière a créé une cassure double brin de l'ADN et par recombinaison homologue avec les séquences cibles *zm-SEQ158* et *zm-SEQ159* également présentes dans le plasmide PHP73878, a introduit la cassette du site d'intégration spécifique dans le génome de maïs. L'expression transitoire des protéines WUS2 et ODP2 faciliterait la régénération de plantules au cours des étapes suivant la transformation. Le pétitionnaire indique avoir sélectionné ensuite les plantes transformées contenant seulement le site d'intégration spécifique grâce à leur caractérisation par SbS.

⁴ Clustered regularly interspaced palindromic repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)

⁵ CRISPR associated protein 9 (protéine 9 associée à CRISPR)

La **seconde étape de la transformation génétique** est effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 sur des lignées transformées de maïs contenant le site d'intégration spécifique. Le but de cette transformation était d'insérer une partie de l'ADN-T du plasmide PHP83175 dans le site d'intégration spécifique au niveau des sites de recombinaison pour la recombinaison FLP. En plus d'un squelette plasmidique, le vecteur PHP83175 porte un ADN-T unique et des gènes de virulence d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales (*virD1*, *virC1*, *virC2*, *virG* et *virB*). Son ADN-T contient six cassettes d'expression dont seulement trois étaient destinées à s'intégrer dans le génome du maïs, celles qui sont encadrées par les deux sites de recombinaison pour la recombinaison FLP. Le tableau 1 résume les différents éléments présents dans l'ADN-T du plasmide PHP83175.

Tableau 1 : Description des six cassettes d'expression entre la bordure droite et la bordure gauche de l'ADN-T du plasmide PHP83175.

Différents éléments de séquences intercalaires ne sont pas indiqués dans ce tableau.

Site de recombinaison	Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 2 ^{ème} colonne)
Cassettes d'expression non destinées à s'intégrer dans la lignée DP915635-4			
	<i>zm-wus2</i> gène <i>Wuschel 2</i>	<i>Zea mays</i>	Promoteur et région intronique du gène de l'actine d' <i>Oryza sativa</i> et terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>
	<i>zm-odp2</i> gène de la « ovule development protein2 »	<i>Zea mays</i>	Promoteur, séquence 5' non traduite et séquence intronique du gène de l'ubiquitine 1 de <i>Zea mays</i> , terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i> et terminateur du gène de la zéine 19-kDa de <i>Zea mays</i>
	<i>mo-Flp exons 1 et 2</i> Exons 1 et 2 du gène de la recombinaison FLP (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Promoteur, séquence 5' non traduite et séquence intronique du gène de l'ubiquitine 1 de <i>Zea mays</i> , exon 1 du gène de la recombinaison FLP, région intronique du gène <i>Ls1</i> de <i>Solanum tuberosum</i> , exon 2 du gène de la recombinaison FLP et terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>
aatB4 Site cible de recombinaison pour l'intégrase du bactériophage lambda			
			Terminateur 35S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur
FRT1 Site cible de recombinaison pour la recombinaison FLP			

Site de recombinaison	Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 2 ^{ème} colonne)
Cassettes d'expression destinées à être intégrées dans la lignée DP915635-4			
	<i>pmi</i> gène d'une phosphomannose isomérase	<i>Escherichia coli K-12</i>	Terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i> et terminateur du gène de la zéine 19-kDa de <i>Zea mays</i>
	<i>mo-pat</i> gène d'une phosphinotricine N-acétyltransférase (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Promoteur et région intronique du gène de l'actine d' <i>Oryza sativa</i> et séquence terminatrice 35 S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur.
LoxP site de recombinaison du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinaison Cre			
			Terminateur du gène de l'ubiquitine de <i>Sorghum bicolor</i> et terminateur du gène de la gamma-kafarine de <i>Sorghum bicolor</i>
aatB1 Site cible de recombinaison pour l'intégrase du bactériophage lambda			
	<i>lpd079Ea</i> Gène de la protéine insecticide IPD079Ea	<i>Ophioglossum pendulum</i>	Trois copies de la région enhancer du gène RCc3 de <i>Sorghum bicolor</i> ayant une expression racinaire spécifique, région promotrice en amont de l'ARNm PCO118362 de <i>Zea mays</i> ayant une expression racinaire spécifique, région intronique du gène de <i>Zea mays</i> , orthologue d'un gène d'une protéine hypothétique d' <i>Oryza sativa</i> , gène supposé de la calmoduline 5 chez le maïs (zm-HPLV9), région terminatrice du gène inhibiteur de subtilisine-chymotrypsine 1B de <i>Sorghum bicolor</i> , région terminatrice du gène de la gamma-zéine 27 kDa de <i>Zea mays</i> , région terminatrice du gène de l'ubiquitine 14 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et région terminatrice du gène <i>In2-1</i> de <i>Zea mays</i> .
aatB2 Site cible de recombinaison pour l'intégrase du bactériophage lambda			

Site de recombinaison	Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 2 ^{ème} colonne)
aatB3 <i>Site cible de recombinaison pour l'intégrase du bactériophage lambda</i>			
FRT6 <i>Site cible de recombinaison pour la recombinase FLP</i>			

Le but recherché de la transformation génétique était d'obtenir une intégration des trois cassettes d'expression souhaitées par recombinaison homologue au niveau des sites cibles de recombinaison FRT. Ces trois cassettes d'expression ont alors remplacé celle du gène *npfl* présente suite à la première étape de transformation génétique.

L'expression transitoire de la recombinase FLP était nécessaire pour pouvoir réaliser cette recombinaison homologue ainsi que l'expression des protéines WUS2 et ODP2 pour favoriser la régénération des plantules cultivées *in vitro*.

La cassette d'expression du gène *pmi* ne possède pas de séquence promotrice, une insertion aux sites de recombinaison FRT lui a permis d'être suffisamment proche du promoteur présent dans la séquence du site d'intégration spécifique pour conduire à la synthèse de la protéine PMI. La présence de la protéine PMI permettant aux cellules de croître sur milieu contenant du mannose, seules les cellules transformées contenant la construction souhaitée pouvaient être sélectionnées sur ce substrat.

Enfin, la présence des séquences insérées souhaitées et l'absence de séquences des différents squelettes plasmidiques ont été démontrées dans des plantes T1 par SbS.

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du maïs DP915635-4 (génération T1) ont été caractérisés par NGS selon la technologie SbS en utilisant pour témoins le maïs quasi-isogénique PHR03 et les 5 plasmides utilisés pour les transformations génétiques. Le pétitionnaire indique que son analyse des résultats obtenus montre une insertion unique des séquences génétiques attendues dans le chromosome 1 du maïs, sans séquence en dehors de celles souhaitées provenant des plasmides PHP73878 et PHP83175. Il n'y aurait pas d'intégration des séquences plasmidiques PHP70605, PHP21139 et PHP21875 dans le génome des plantes T1. Le GT « Biotechnologie » ne peut pas vérifier ces affirmations en raison de l'absence des données de SbS dans le dossier de saisine (annexe manquante).

Le séquençage ciblé (méthode Sanger) des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (environ 2257 pb en 5' et 2046 pb en 3') ainsi que de l'insert complet pour le maïs DP915635-4 et des régions flanquantes pour son témoin (PHR03), mettrait en évidence une identité de séquences avec les séquences attendues provenant du plasmide PHP73878 au niveau des sites d'insertion (séquences de recombinaison) et aucune délétion dans le génome du maïs. L'absence de séquences en dehors de celles attendues suite aux deux transformations serait confirmée par le séquençage complet de l'insert. La substitution d'une base nucléotidique, A en C, serait mise en évidence dans le promoteur de l'ubiquitine 1 situé dans l'insert. Là aussi, il est nécessaire que le pétitionnaire complète le dossier en apportant les données de

caractérisation des séquences de l'insert et des régions flanquantes dans le maïs DP915635-4 (annexe manquante).

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des jonctions et de l'insert ne mettent en évidence aucune identité totale, globale ou locale avec des protéines toxiques connues (2020). Six ORF présentent des homologies avec des protéines allergéniques connues. Ce point est discuté au chapitre II.1.5 (allergénicité).

Les analyses bioinformatiques montrent que l'insertion n'aurait pas interrompu une séquence codante ou un élément régulateur connu chez le maïs. Elles confirment aussi la localisation de l'insertion des cassettes d'intérêt dans le chromosome 1, par comparaison avec le génome public du maïs B73.

Le maïs DP915635-4 a été cultivé sur 6 sites (5 aux USA et 1 au Canada) en 2019 avec ou sans traitement au glufosinate-ammonium pour le maïs GM. Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD079Ea ont été quantifiées par ELISA dans différentes parties de la plante (racines, feuilles, pollen, fourrage et grains) et à différents stades de développement de l'hybride F1 (PH1KTF/PHR03). Les concentrations des trois protéines sont suffisantes pour leur quantification dans tous les tissus analysés. Après ajustement avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine, les teneurs moyennes les plus élevées dans le maïs DP915635-4 respectivement traité ou non traité au glufosinate-ammonium sont rencontrées dans les jeunes racines pour la protéine IPD079Ea (20 et 18 µg/g de matière sèche), dans le pollen pour la protéine PAT (82 et 83 µg/g de matière sèche) et dans les feuilles au stade de la plante utilisée pour produire le fourrage pour la protéine PMI (34 et 33 µg/g de matière sèche).

Le tableau 2 présente les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD079Ea mesurées dans les grains et le fourrage qui sont à l'origine des produits consommés en alimentation humaine et animale.

Tableau 2 : Teneurs en protéines exogènes ajustées avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine, dans le fourrage et les grains de maïs DP915635-4 traité ou non avec du glufosinate-ammonium (exprimées en µg/g de matière sèche).

	Protéine exogène	PAT	PMI	IPD079Ea
Grains	Maïs non traité Moyenne (gamme)	6,8 (4,1-11)	3,6 (1,8-6,7)	0,24 (0,10-0,48)
	Maïs traité Moyenne (gamme)	7,8 (1,7-14)	4,7 (1,6-9,9)	0,21 (<0,069-0,40)
Fourrage	Maïs non traité Moyenne (gamme)	12 (4,5-18)	12 (7,6-15)	0,29 (0,10-0,53)
	Maïs traité Moyenne (gamme)	12 (5-20)	13 (7,6-15)	0,28 (0,14-0,47)

Les niveaux d'expression des protéines PAT, PMI et IPD079Ea dans les grains et dans le fourrage ne sont pas modifiés par le traitement avec du glufosinate-ammonium.

La stabilité génétique du locus GM du maïs DP915635-4 a été confirmée par Southern blot sur cinq générations (T1, T2, T3, T4 et T5).

L'analyse de ségrégation de l'insert réalisée par PCR quantitative sur 5 générations (F1, T2, T3, T4, T5) permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. La co-ségrégation du génotype avec le phénotype (tolérance au glufosinate-ammonium) est également vérifiée.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Dans la mesure où la vérification des données de séquençage actuellement absentes du dossier initial confirmerait les informations transmises, les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs DP915635-4 ne soulèveraient pas de question particulière liée à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine.

II.1.3. Evaluation comparative

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

Le maïs DP915635-4 est comparé à l'hybride F1 témoin quasi-isogénique (PH1KTF/PHR03). Le pétitionnaire utilise vingt variétés hybrides commerciales non génétiquement modifiées comme variétés de référence dans les essais.

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

Le maïs DP915635-4, l'hybride témoin quasi-isogénique et les variétés de référence (quatre variétés par site) ont été cultivés en 2019 sur 10 sites (8 aux USA et 2 au Canada). Ces sites expérimentaux sont indiqués par le pétitionnaire comme représentatifs de la production de maïs aux USA et au Canada. Chaque modalité (variété quasi-isogénique, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Pour la variété génétiquement modifiée, deux modalités sont réalisées : soit les plantes subissent les mêmes traitements que les variétés témoins, soit elles sont traitées avec du glufosinate-ammonium. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011, 2015).

Des échantillons de grains et de fourrage ont été récoltés sur les 10 sites d'essais. Les analyses phénotypiques et agronomiques ont été réalisées sur tous les sites et les analyses de composition sur les échantillons de 8 sites parmi ces 10 (1 site au Canada et 7 sites aux USA). Le pétitionnaire indique que le choix de ces 8 sites est basé sur une distribution géographique permettant de représenter la diversité des conditions pédoclimatiques et qu'il a eu lieu avant la réalisation des analyses.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) réalisées avec un modèle linéaire à effets mixtes incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du maïs DP915635-4 traité ou non avec du glufosinate-ammonium, de la variété témoin quasi-isogénique ou des variétés commerciales de référence),
- 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 le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Le maïs DP915635-4 (traité ou non avec du glufosinate-ammonium) est comparé à la variété témoin quasi-isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les

variables en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis.

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

L'analyse de composition a été réalisée sur les grains et le fourrage. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2002). Le GT « Biotechnologie » estime que cette analyse est complète.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 70 composés sur les 80 analysés à partir des grains et du fourrage sont utilisables pour les analyses statistiques.

Sur la base de ces résultats, l'analyse combinée de l'ensemble des 8 sites d'expérimentation montre que les grains de maïs DP915635-4 traité ou non avec du glufosinate-ammonium et le fourrage de maïs DP915635-4 non traité avec du glufosinate-ammonium sont équivalents aux variétés commerciales de référence.

Le fourrage de maïs DP915635-4 traité au glufosinate-ammonium présente deux « non-équivalences probables » (catégorie III) avec les variétés commerciales de référence, une de type 5⁶ pour sa teneur en carbohydrates et une de type 6⁷ pour sa teneur en protéines.

A partir d'une base de données interne (multi-sites et multi-années) de composition (grains et fourrage) de variétés de maïs non génétiquement modifiées, une analyse statistique a été réalisée par le pétitionnaire afin de générer des intervalles de tolérance pour les différents composés du maïs à partir de données historiques sur 167 variétés de maïs de référence, non génétiquement modifiées. Les données analytiques présentes dans cette base de données interne ont été obtenues à partir d'échantillons provenant de 31 essais multi-sites réalisés entre 2003 et 2018 sur 171 sites représentatifs des zones de production du maïs en majorité aux USA et également en Argentine, au Chili, au Canada et au Brésil. Ces intervalles de tolérance sont utilisés par le pétitionnaire pour appréhender la variabilité naturelle des paramètres biologiques des variétés de maïs commerciales.

Le pétitionnaire présente une analyse complémentaire pour déterminer si les variations de composition du fourrage de maïs entre la variété DP915635-4 traité avec du glufosinate-ammonium et les variétés de référence ont une signification biologique potentielle. Pour les deux composés (protéines et carbohydrates) présentant une non-équivalence probable (catégorie III) avec les variétés de référence de cette étude, le pétitionnaire regroupe les différentes conclusions des comparaisons de composition réalisées dans cette étude et confronte les teneurs en substances avec les intervalles de tolérance générés à partir de sa base de données interne.

Les teneurs en protéines du fourrage de maïs DP915635-4 traité ou non au glufosinate-ammonium sont toutes comprises dans la gamme des mesures réalisées pour les variétés de référence de l'étude et dans l'intervalle de tolérance construit à partir de l'étude sur la base de données interne du pétitionnaire. La teneur en protéines d'un échantillon sur 32 de fourrage de maïs témoin quasi-isogénique est par contre légèrement inférieure aux valeurs de la gamme de référence et de l'intervalle de tolérance. Le pétitionnaire indique que cette teneur

⁶ Type 5 : non équivalence probable avec les variétés de référence et non différence avec le maïs témoin quasi-isogénique

⁷ Type 6 : non équivalence probable avec les variétés de référence et différence avec le maïs témoin quasi-isogénique

est tout de même dans la gamme de données de la littérature pour les grains de maïs (AFSI, 2019).

Les teneurs en carbohydrates du fourrage de maïs DP915635-4 traité ou non au glufosinate-ammonium et du maïs témoin quasi-isogénique sont toutes comprises dans l'intervalle de tolérance construit à partir de la base de données interne du pétitionnaire mais les teneurs en carbohydrates de 3 échantillons sur 32 de fourrage de maïs témoin quasi-isogénique sont supérieures aux valeurs de la gamme de référence et légèrement supérieure pour la teneur d'un échantillon sur 32 de fourrage de maïs DP915635-4 traité au glufosinate-ammonium.

Le GT « Biotechnologie » conclut de l'ensemble de ces éléments que les non-équivalences de composition du fourrage de maïs DP915635-4 traité au glufosinate-ammonium pour les teneurs en protéines et en carbohydrates n'ont pas de signification biologique.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Pour les 10 sites d'expérimentation, les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 11 paramètres dont 8 sont utilisables pour les analyses statistiques.

A l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP915635-4 traité ou non apparaît équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique et n'est pas différent de son témoin quasi-isogénique. Il en est de même pour les effets des stress abiotiques et biotiques mais les conditions de culture parfaitement maîtrisées (absence d'attaque de ravageurs) lors de l'essai n'ont pas permis de mettre en évidence un éventuel avantage phénotypique pour ce nouveau maïs exprimant une protéine insecticide.

Un essai d'efficacité au champ a été conduit sur 14 sites aux USA en 2020 par infestation manuelle avec des œufs de chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*) de plantes de maïs DP915635-4 et témoin. Le pétitionnaire conclut à partir des données sur les blessures racinaires que le maïs DP915635-4 montre une efficacité de résistance contre la chrysomèle des racines du maïs.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs DP915635-4 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, à l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP915635-4 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence pour la composition des grains et du fourrage, ainsi que sur le plan agronomique et phénotypique.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le maïs DP915635-4 exprime les protéines exogènes PAT, PMI et IPD079Ea (cf chapitre II.1.2.2).

La protéine IPD079Ea est une nouvelle protéine. Elle n'a jamais été utilisée dans la transformation de plantes génétiquement modifiées. Les propriétés insecticides de la protéine IPD079Ea sont liées aux dommages qu'elle engendre suite à son ingestion, sur l'épithélium intestinal des larves de certains coléoptères conduisant ainsi à leur mort.

La protéine IPD079Ea utilisée pour les différentes études a été produite dans une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli*. Son équivalence biochimique avec la protéine IPD079Ea purifiée à partir de feuilles de maïs DP915635-4 a été démontrée. La protéine IPD079Ea est rapidement dégradée en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro*.

La stabilité thermique de la protéine IPD079Ea a été déterminée en recherchant son activité biologique contre des larves de chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*) lorsqu'elle est ajoutée à leur alimentation. Pour cela, la protéine a été soumise à différents traitements thermiques avant incorporation dans l'aliment. L'inactivation de la protéine IPD079Ea est montrée suite à un chauffage supérieur à 50 °C pendant 30 min.

Le pétitionnaire présente une étude de toxicité aiguë chez la souris CD1 par gavage à la dose limite de 5000 mg/kg de poids corporel (p.c.) réalisée en 2019 selon la ligne directrice OCDE 423 (2001). En 2020, une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez la souris CD1 (10 souris par sexe) a été menée à 3 doses de 100, 300 et 1000 mg/kg p.c./jour de la protéine IPD079Ea. Elle a été réalisée selon la ligne directrice OCDE 407 (2008) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données de cette étude ne mettent pas en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine IPD079Ea.

La caractérisation de la protéine PAT purifiée à partir de feuilles de maïs DP915635-4 et de la protéine PMI purifiée à partir de racines de maïs DP915635-4 montre leur similarité avec des protéines PAT et PMI de référence. Les protéines PAT et PMI présentes dans le maïs DP915635-4 sont semblables à des protéines présentes dans d'autres plantes génétiquement modifiées ayant fait l'objet d'autorisations de mise sur le marché. En conséquence, le pétitionnaire renvoie aux évaluations antérieures réalisées par l'EFSA sur ces plantes, aux données bibliographiques et à un historique de consommation sûre. La présentation d'une synthèse des principaux résultats toxicologiques de ces deux protéines serait souhaitable. Aucune étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les protéines PAT et PMI n'est disponible.

Les trois protéines exogènes PAT, PMI et IPD079Ea ne présentent pas d'identité de séquences globale ou locale avec des protéines toxiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2020).

Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD079Ea sont faibles dans les grains et le fourrage issus du maïs DP915635-4 traité ou non avec du glufosinate-ammonium (cf chapitre II.1.2.2).

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines PAT, PMI et IPD079Ea. Ce point devrait être argumenté.

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

Le pétitionnaire ne fournit pas d'information sur la présence éventuelle de nouveaux constituants en dehors des protéines IPD079Ea, PAT et PMI.

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 des aliments pour animaux dérivés du maïs DP915635-4.

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

Une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur a été menée en 2020-2021 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (2018) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données brutes sous format électronique et le programme de calcul sont fournis.

Six groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, souche Sprague-Dawley (CrI :CD) ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée DP915635-4,
- 33 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée DP915635-4 auquel s'ajoutent 17 % de maïs quasi-isogénique non génétiquement modifié,
- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs quasi-isogénique non génétiquement modifié,
- 50 % (p/p) de grains moulus de 3 variétés commerciales non génétiquement modifiées, P1197, P6158 et P6365.

Le maïs DP915635-4 utilisé dans cette étude a été traité avec du glufosinate-ammonium. Le pétitionnaire cite le rapport d'étude comportant les données sur la culture ayant permis de produire les grains mis en œuvre pour la production des aliments destinés aux rats mais ce rapport d'étude n'est pas fourni dans le dossier. Le fonds génétique des variétés de maïs DP915635-4 et de maïs témoin quasi-isogénique devrait être indiqué.

Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux différents groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants. Les données individuelles de l'étude sont présentées.

L'étude de toxicité subchronique conduite avec l'aliment complet chez le rat n'a pas mis en évidence d'effets toxiques imputables au traitement, dans les conditions de l'étude, ni de modifications macroscopiques ou histologiques imputables au traitement. Les données historiques du centre investigateur doivent être fournies pour pouvoir finaliser l'expertise.

Le pétitionnaire s'appuie sur l'article de Hong *et al.* (2017) pour justifier le nombre d'animaux par groupe. Le GT « Biotechnologie » considère que cet article n'est pas adapté puisque présentant des tailles d'effets cible qui ne sont pas considérées comme appropriées (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine). Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %. Le pétitionnaire utilise dans son analyse des données, une correction pour tests multiples pour contrôler le FDR (false discovery rate) qui n'est pas prise en compte dans le calcul de puissance et qui conduit à une diminution de la puissance réelle de l'étude (van der Voet, 2018). De plus, en cas « d'outliers », le pétitionnaire refait l'analyse en les enlevant et sans appliquer la correction pour tests multiples pour contrôler le FDR. Cette différence de méthode n'est pas justifiée.

Le GT « Biotechnologie » considère que le calcul de puissance présenté par le pétitionnaire n'est pas valide.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines PAT, PMI et IPD079Ea ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs DP915635-4 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier, en raison du calcul de puissance considéré comme non valide et de l'absence des données historiques du centre investigateur.

II.1.5. Allergénicité

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

Le potentiel allergénique des protéines IPD079Ea, PAT et PMI exprimées dans le maïs DP915635-4 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2017), à savoir :

- l'innocuité des sources des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée ;
- l'absence d'identités globales et locales avec les allergènes d'une banque de données ;
- la dégradation des protéines exprimées par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées ;
- la thermosensibilité des protéines exprimées,
- la faible quantité de protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée.

Les sources des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée sont *Streptomyces viridochromogenes* pour PAT, *Escherichia coli* souche K-12 pour PMI et *Ophioglossum pendulum* pour IPD079Ea. La bibliographie présentée n'évoque pas de risque particulier pour ces sources.

Les informations sur la dégradation dans des tests de digestion *in vitro* et sur la thermosensibilité des protéines PAT et PMI sont issues de la littérature. La protéine IPD079Ea, jamais synthétisée par une plante génétiquement modifiée, a fait l'objet d'une étude complète décrite au chapitre II.1.4.1. La protéine IPD079Ea est rapidement dégradée en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro*. Le bioessai réalisé après chauffage de la protéine IPD079Ea à différentes températures montre une inactivation de cette protéine à partir de 50 °C.

Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD079Ea sont faibles dans les grains et le fourrage issus du maïs DP915635-4 traité ou non avec du glufosinate-ammonium (cf chapitre II.1.2.2).

L'analyse bioinformatique des ORF potentiels au niveau des jonctions et de l'insert dans le maïs DP915635-4 permet au pétitionnaire d'identifier 6 ORFs dont les protéines putatives correspondantes présentent un pourcentage d'identités de séquences globales > 35 % avec des allergènes de la base COMPARE (2020). Ces identités ne dépassent pas 39 %, ont des E-scores souvent très élevés, sont régulièrement dispersées le long des séquences et n'intéressent qu'un nombre très limité d'acides aminés successifs. Ces identités de séquences paraissent fortuites et dépourvues de signification biologique.

La recherche d'identités de séquences entre les protéines PAT, PMI et IPD079Ea et des protéines allergéniques avérées effectuée avec l'algorithme FASTA et une fenêtre glissante de 80 résidus ne conduit pas le pétitionnaire à identifier des identités préoccupantes.

La recherche d'identités de séquences globales effectuée par le GT « Biotechnologie » sur les protéines PAT, PMI et IPD079Ea exprimées dans le maïs génétiquement modifié DP915635-4 ne présentent pas d'identités globales avec les allergènes de la banque AllergenOnline (version 2021). Par contre, la recherche des identités locales (100 % d'identité sur une fenêtre glissante de 8 résidus) effectuée par le GT « Biotechnologie » montre une identité locale (séquence DLSDKETT) de la protéine PMI avec la parvalbumine Ran e 1 de grenouille (*Rana* sp.). La présence d'un site de clivage par les enzymes digestives conduit le GT « Biotechnologie » à ne pas suspecter un risque allergique particulier d'autant que cette identité locale entre la protéine PMI et la parvalbumine α de grenouille ne porte que sur une région très limitée de la protéine.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'identité de séquence entre les protéines PAT, PMI et IPD079Ea et des toxines avérées ou des protéines adjuvantes

confirmées. Par ailleurs, les faibles teneurs de ces protéines dans le maïs DP915635-4 et leur sensibilité aux protéases digestives sont *a priori* incompatibles avec un effet adjuvant significatif dans le cadre d'un apport alimentaire modéré en maïs génétiquement modifié DP915635-4.

La recherche de peptides immunotoxiques potentiels (non IgE-mediated adverse immune reactions to foods) ne met pas en évidence d'identité de séquence avec les peptides identifiés expérimentalement comme épitopes restreints capables de s'ancrer dans la corbeille du CMH-II des groupes HLA-DQ2 et HLA-DQ8 et de déclencher une réponse immunotoxique. Toutefois, en tolérant jusqu'à 3 mésappariements (mismatches) dans la recherche bioinformatique des peptides immunotoxiques, quatre peptides de la protéine PMI possédant pour deux, la séquence ESPV et les deux autres, la séquence ELPF, et deux peptides de la protéine PAT possédant la séquence ELPF sont identifiés comme homologues du motif ELPY de certains peptides DQ2-spécifiques. L'analyse du docking moléculaire de ces 6 peptides dans la corbeille des groupes HLA-DQ2 (code PDB 1S9V) et HLA-DQ8 (code PDB 4GG6) effectuée par le GT « Biotechnologie » montre que l'ancrage de ces peptides n'est que partiel et n'est pas susceptible de déclencher une réponse immunotoxique.

Les trois protéines exprimées dans le maïs DP915635-4, PAT, PMI et IPD079Ea, satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA et peuvent donc être considérées comme étant peu allergéniques.

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

Aucune des informations disponibles au sujet du maïs DP915635-4 ne laisse supposer que ce maïs puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de maïs conventionnelles.

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

Sur la base des données et arguments fournis par le pétitionnaire et complétés par le GT « Biotechnologie », le potentiel allergénique des protéines PAT, PMI et IPD079Ea exprimées dans le maïs DP915635-4 peut être considéré comme faible. Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les grains du maïs DP915635-4 et n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes.

Enfin, l'allergénicité du maïs DP915635-4 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

En 2020, le pétitionnaire a réalisé une évaluation nutritionnelle des grains de maïs DP915635-4, de la variété témoin quasi-isogénique et de trois variétés de référence non génétiquement modifiées dans l'alimentation de poulets de souche Ross 708. Le maïs DP915635-4 utilisé dans cette étude a été traité avec du glufosinate-ammonium. Les trois variétés de référence sont les mêmes que celles mises en œuvre dans l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat (chapitre II.1.4.4).

Le maïs a été incorporé à des taux de 60 % dans les aliments de démarrage (0-21 jours), de 64 % dans les aliments de croissance (22-35 jours) et de 67 % dans les aliments de finition (36-42 jours). Les poulets ont été élevés pendant 42 jours en parquet de 10 animaux, avec 6 parquets par sexe et par groupe expérimental.

Le pétitionnaire cite le rapport d'étude comportant les données sur la culture ayant permis de produire les grains mis en œuvre pour la production des aliments destinés aux poulets qui serait la même culture que pour l'alimentation des rats de l'étude de toxicité subchronique. Ce

rapport d'étude n'est pas fourni dans le dossier. Le fonds génétique des variétés de maïs DP915635-4 et de maïs témoin quasi-isogénique devrait être indiqué.

L'analyse de composition des différents régimes n'a pas mis en évidence de différence entre les lots. Les teneurs en protéines PAT, IPD079Ea, PMI ont été mesurées dans les différentes rations de « démarrage », « croissance » et « finition » produites avec des grains de maïs DP915635-4.

Le modèle statistique utilisé est un modèle linéaire avec une analyse de variance à deux facteurs (sexe et variété de maïs). Le niveau des tests statistiques est de 5 % et une procédure de test multiple est utilisée pour contrôler le FDR (false discovery rate). L'étude de puissance statistique fournie est jugée acceptable.

Les paramètres de performance de croissance, de mortalité et de rendement en carcasse mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs DP915635-4 ne sont pas différents significativement de ceux qui sont mesurés sur les poulets nourris avec les grains de la variété témoin quasi-isogénique ou des variétés de référence.

Les grains issus des maïs DP915635-4, témoin quasi-isogénique et des variétés de référence non génétiquement modifiées possèdent donc des valeurs nutritionnelles équivalentes.

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

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au maïs DP915635-4 pour l'animal et l'Homme.

Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2019 pour caractériser le maïs DP915635-4, après ajustement avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine (chapitre II.1.2.2). Dans les grains de maïs DP915635-4 traité avec du glufosinate-ammonium, elles sont de 7,8 µg/g de matière sèche et de 6,6 µg/g de matière fraîche pour PAT, de 4,7 µg/g de matière sèche et de 3,9 µg/g de matière fraîche pour PMI et de 0,21 µg/g de matière sèche et de 0,18 µg/g de matière fraîche pour IPD079Ea. Dans le fourrage de maïs DP915635-4 traité avec du glufosinate-ammonium, elles sont de 12 µg/g de matière sèche pour PAT, de 13 µg/g de matière sèche pour PMI et de 0,28 µg/g de matière sèche pour IPD079Ea.

L'estimation de la consommation journalière des protéines PAT, PMI et IPD079Ea **par l'animal** est fondée sur les données de l'OCDE (2013) relatives à la consommation de maïs par les animaux d'élevage, les teneurs moyennes en protéines du fourrage et des grains de maïs DP915635-4 et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré étant du maïs DP915635-4).

En utilisant les données de l'OCDE (2013) et ce scénario du « pire des cas », les apports journaliers les plus élevés sont obtenus :

- Chez les poulets de chair et les poules pondeuses pour la consommation de grains (ingestion de **0,23** mg/kg de poids corporel/jour pour PMI et de **0,010** mg/kg de poids corporel/jour pour IPD079Ea pour les poulets de chair et les poules pondeuses et pour PAT, de **0,39** mg/kg de poids corporel/jour pour les poulets de chair et de 0,37 mg/kg de poids corporel/jour pour les poules pondeuses),
- Chez les vaches laitières pour la consommation de fourrage (ingestion de **0,30** mg/kg de poids corporel/jour pour PMI, de **0,0065** mg/kg de poids corporel/jour pour IPD079Ea et de **0,28** mg/kg de poids corporel/jour pour PAT)

- Chez les poules pondeuses et les vaches laitières pour la consommation fourrage + grains (ingestion de **0,31** mg/kg de poids corporel/jour pour PMI, de **0,012** mg/kg de poids corporel/jour pour IPD079Ea et de **0,46** mg/kg de poids corporel/jour pour PAT chez les poules pondeuses et ingestion de **0,35** mg/kg de poids corporel/jour pour PMI, de **0,0089** mg/kg de poids corporel/jour pour IPD079Ea et de **0,37** mg/kg de poids corporel/jour pour PAT chez les vaches laitières).

Le pétitionnaire a réalisé en 2020 une étude sur les expositions alimentaires aiguë et chronique **de l'Homme** aux protéines PAT, PMI et IPD079Ea selon l'EFSA (2019b) en utilisant les données du fichier Excel sur le maïs mis à disposition sur le site de l'EFSA⁸ (accès le 1^{er} juin 2020).

Le pétitionnaire a exclu la consommation d'huile, d'amidon de maïs et de sirop de maïs de cette estimation en raison de la teneur en protéines négligeable de ces denrées. Il a aussi exclu la consommation des compléments alimentaires à base de pollen, n'ayant pas pu trouver un modèle de calcul adapté.

Les denrées contenant du maïs et les facteurs de conversion proviennent des statistiques européennes de consommation de maïs. Les facteurs de conversion sont appliqués pour calculer l'apport de chaque denrée en « équivalent matière première » (grains de maïs).

Des hypothèses conservatives sont formulées par le pétitionnaire :

- tout le maïs consommé est du maïs DP915635-4,
- les procédés de transformation des aliments n'impactent pas les concentrations en protéines exogènes PAT, PMI et IPD079Ea qui restent identiques à celles présentes dans les grains de maïs DP915635-4.

Les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines PAT, PMI et IPD079Ea via la consommation de denrées issues de grains de maïs DP915635-4 sont alors calculées par le pétitionnaire selon les mêmes équations et pour toutes les catégories de population et chaque étude alimentaire présente dans la base de l'EFSA. Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées dans les grains de maïs DP915635-4 traité avec du glufosinate-ammonium en µg/g de matière fraîche utilisées pour les calculs figurent en haut de ce chapitre. Le pétitionnaire ne fournit pas la feuille de calcul de l'apport en protéines PAT, PMI et IPD079Ea pour chaque denrée contributrice mais seulement la somme des apports alimentaires en ces protéines par catégorie de population pour chaque étude alimentaire. L'identité des denrées les plus contributrices n'est donc pas accessible pour l'expertise.

Sont repris dans le tableau 3 suite aux calculs réalisés par le pétitionnaire en 2020, les expositions alimentaires (moyenne et forts consommateurs) en protéines PAT, PMI et IPD079Ea les plus élevées (µg/kg de poids corporel/jour) en indiquant aussi le pays et la catégorie de population.

⁸ <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>

Tableau 3 : Expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines PAT, PMI et IPD079Ea via la consommation de denrées issues de grains de maïs DP915635-4. Les valeurs sont exprimées en µg/kg de poids corporel/jour.

		Pays	Catégorie de population	PAT	PMI	IPD079Ea
Exposition aiguë	Moyenne	Danemark	Enfants en bas âge (12 à 35 mois)	8,20	4,84	0,22
	Forts consommateurs	Roumanie	Autres enfants (3 à 9 ans)	100,33	59,29	2,74
Exposition chronique	Moyenne	Danemark	Enfants en bas âge (12 à 35 mois)	8,20	4,84	0,22
	Forts consommateurs	Finlande	Nourrissons (0 à 11 mois)	37,25	22,01	1,02

II.3 Caractérisation des risques

Ce chapitre n'a pas été documenté par le pétitionnaire.

L'exposition en protéines PAT, PMI et IPD079Ea des poulets impliqués dans l'étude nutritionnelle (paragraphe II.1.6) pourrait être calculée et comparée aux estimations de la consommation journalière de ces protéines chez les poulets (paragraphe II.2). En l'absence d'études d'alimentarité spécifiques, le GT « Biotechnologie » considère que le risque ne peut pas être caractérisé pour les autres animaux de rente.

De même, la caractérisation des risques pour l'Homme pourrait être réalisée à partir des estimations d'exposition et d'une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat répondant pleinement aux exigences du Règlement (UE) n°503/2013.

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 consécutive à sa mise sur le marché.

II.7 Informations complémentaires sur la sécurité des denrées et des aliments pour animaux génétiquement modifiés

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2010-2020, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (2019a) pour procéder à cette revue systématique de la littérature.

La formulation de la question, la recherche par mots clés, les combinaisons des termes et les opérateurs booléens sont appropriés.

Les quatre bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du maïs DP915635-4. Elle a été complétée manuellement par ajout des références complémentaires identifiées dans des avis scientifiques provenant de 4 agences sanitaires⁹. Les listes des titres des publications identifiées par les recherches dans les 4 bases de données sont fournies. Les critères d'inclusion pour la sélection des articles sont décrits et jugés adéquats par le GT « Biotechnologie ».

⁹ USDA, CFIA, FSANZ, Japan MAFF

Le pétitionnaire a fait appel à 2 « reviewers » pour conduire cette analyse de façon indépendante. Le GT « Biotechnologie » regrette l'absence d'informations sur le choix des « reviewers » qui doivent renseigner leurs niveaux de compétences et d'indépendance. Un test de cohérence d'analyse entre les 2 « reviewers » est présenté.

Cette revue de la littérature a permis d'identifier 615 références distinctes. Après sélection sur les critères d'inclusion, 9 références ont été soumises à lecture et évaluation. Après analyse, les « reviewers » ont exclu 7 publications (titres et raisons d'exclusion fournies) et ont jugé pertinentes 2 publications. Ces 2 publications sont mises à disposition dans le dossier. Elles portent sur la digestibilité *in vitro* de différentes protéines exprimées dans des graines de plantes génétiquement modifiées dont la protéine PAT (Schafer *et al.*, 2016) et sur des activités enzymatiques non-spécifiques de la phosphinotricine de la protéine BAR (Bialaphos resistance) qui peuvent conduire à une N-acétylation d'acides aminés de la plante (Chris *et al.*, 2017). Le GT « Biotechnologie » considère que l'analyse de la littérature a été correctement réalisée.

Le pétitionnaire conclut que le faible nombre de publications obtenues après l'étape de « scoping review » ne lui permet pas de réaliser une revue systématique. Selon le pétitionnaire, cette « scoping review » n'a pas mis en évidence de risque sanitaire pour la consommation humaine ou animale du maïs DP915635-4. Le GT « Biotechnologie » considère que les 2 articles sélectionnés ne mettent pas en évidence de risque sanitaire.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Dans la mesure où la vérification des données de séquençage actuellement absentes du dossier initial confirmerait les informations transmises, l'ensemble des éléments fournis pour la caractérisation moléculaire ne permettrait pas de mettre en évidence de risque lié à l'utilisation de ce maïs en alimentation humaine ou animale.

A l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP915635-4 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence pour la composition des grains et du fourrage, ainsi que sur le plan agronomique et phénotypique. L'évaluation nutritionnelle chez le poulet montre que les grains issus des maïs DP915635-4, témoin quasi-isogénique et des variétés de référence non génétiquement modifiées possèdent des valeurs nutritionnelles équivalentes.

Le potentiel allergénique des protéines PAT, PMI et IPD079Ea paraît faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA. L'allergénicité du maïs DP915635-4 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines PAT, PMI et IPD079Ea ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale. Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs DP915635-4 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier, en raison du calcul de puissance considéré non valide et de l'absence des données historiques du centre investigateur.

Dans ces conditions, le « GT Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du maïs DP915635-4.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie », qui constate ne pas pouvoir se prononcer sur la sécurité du maïs DP915635-4 compte tenu de l'absence dans le dossier de certaines données au regard des exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013.

Sachant que des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier à la demande de l'EFSA, le contenu du présent avis ne préjuge pas des conclusions qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu d'un dossier complété pour répondre pleinement aux exigences du Règlement européen.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

OGM, maïs DP915635-4, tolérance au glufosinate-ammonium, résistance à des insectes, PAT, PMI, IPD079Ea

GMO, DP915635-4 maize, glufosinate-ammonium tolerance, resistance to insects, PAT, PMI, IPD079Ea

BIBLIOGRAPHIE

AFSI. 2019. Crop Composition Database, Version 7.0. Agriculture and Food Systems Institute, www.cropcomposition.org

Christ B, Hochstrasser R, Guyer L, Francisco R, Aubry S, Hortensteiner S et Weng J-K. 2017. "Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene BAR." *Nature Plants* 3, 937-945.

EFSA. 2017. "Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants". *EFSA Journal* 15: 1–49.

EFSA. 2019a. "Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market - Note on literature searching to GMO risk assessment guidance" *EFSA journal*, 2019:EN-1614, 1-62.

EFSA. 2019b. "Statement on the human dietary exposure assessment to newly expressed proteins in GM foods". *EFSA Journal* 17 (7):5802, 18 pp.

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

EFSA GMO Panel. 2010. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. The *EFSA Journal* 8(1): 1250.

EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants". *EFSA Journal* 9(5): 2150, 37 pp.

- EFSA GMO Panel. 2015. "Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants". EFSA Journal 13(6):4128, 44 pp.
- Hong B, Du Y, Mukerji P, Roper JM, Appenzeller LM. 2017. « Safety Assessment of Food and Feed from GM Crops in Europe: Evaluating EFSA's Alternative Framework for the Rat 90-day Feeding Study ». Journal of agricultural and food chemistry 65, 5545-5560.
- ISAAA. 2019. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019 : Biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier." ISAAA brief N° 55. ISAAA:Ithaca, NY.
- NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).
- OCDE. 2002. "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites." Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 6. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).
- OCDE. 2001. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method". Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France), 1-14
- OCDE. 2008. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°407. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents". Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France), 1-13
- OCDE. 2013. "Guidance Document on Residues in Livestock." Series on Pesticides, n° 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).
- OCDE. 2018. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents." Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France), 1-16
- Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.
- 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. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.
- Schafer BW, Embrey SK et Herman RA. 2016. "Rapid simulated gastric fluid digestion of in-seed/grain proteins expressed in genetically engineered crops". Regulatory Toxicology and Pharmacology 81, 106-112.
- US EPA 2002 - Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency.
- van der Voet H. 2018. "Safety assessments and multiplicity adjustment: Comments on a recent paper". Journal of Agricultural and Food Chemistry 66 (9), 2194-2195.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2021). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du maïs génétiquement modifié DP915635-4 développé pour être résistant à certains insectes (chrysomèles, ravageurs des racines) et tolérant au glufosinate-ammonium pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-172). Maisons-Alfort : Anses, 21 p.