

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 septembre 2023

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 DP910521 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et pour être résistant à certains lépidoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-174)

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 19 janvier 2023 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) 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 DP910521 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et pour être résistant à certains lépidoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-174) ».

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 génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA permet cependant aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. Dans ce cadre, la DGAI a sollicité l'Anses pour participer à cette consultation par l'EFSA dans un délai de 90 jours et pour émettre un avis sur ce dossier initial, vis-à-vis des exigences de la réglementation applicable sur ce dossier.

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 16 février, 15 mars et 7 juin 2023 sur la base de rapports initiaux rédigés par huit rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guide de l'EFSA et du panel GMO de l'EFSA ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ». Les commentaires à transmettre à l'EFSA ont été validés par le GT en séance du 15 mars 2023 et transmis à la DGAI le 30 mars 2023 afin d'alimenter la réponse des États-membres à la phase de consultation par l'EFSA.

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 utilisées ci-dessous.

A. Informations générales

Le maïs est une culture des zones tempérées à tropicales. En 2021 (FAOStat¹), les dix premiers pays producteurs étaient les Etats-Unis, la Chine, le Brésil, l'Argentine, l'Ukraine, l'Inde, le Mexique, l'Indonésie, l'Afrique du Sud et la France, qui représentaient environ 80 % de la production mondiale. Cette production était de 1 210 235 135 tonnes pour une surface cultivée de 205 870 016 hectares (dont 72 987 920 tonnes pour une surface cultivée de 9 247 050 hectares dans l'Union européenne). En 2019, 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 contient également des substances anti-nutritionnelles (acide phytique, DIMBOA³, inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine, raffinose).

Le maïs DP910521 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *cry1B.34*, *mo-pat* et *pmi* codant respectivement :

- une protéine insecticide (protéine Cry1B.34), qui endommage suite à son ingestion l'épithélium intestinal des larves de certains insectes et conduit ainsi à leur mort ;
- une phosphotricine N-acétyltransférase (protéine PAT), qui confère à la plante la tolérance au glufosinate-ammonium en l'acétylant en N-acétyl L-glufosinate (NAG). Le NAG est non phytotoxique ;
- une phosphomannose isomérase (protéine PMI), qui catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate, utilisée comme marqueur de sélection des tissus génétiquement modifiés.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs DP910521. Il ne concerne pas sa mise en culture. Pour rappel, toutes les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et les aliments destinés à l'alimentation animale dans l'Union européenne (UE) sont, entre autres, soumis à une limite maximale pour les résidus (LMR) de produits phytopharmaceutiques afin de protéger la santé animale et humaine (Règlement (CE) n° 396/2005).

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

B. Informations scientifiques

B.1. Identification et caractérisation des dangers

B.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 PH184C. Concernant les caractéristiques générales de la plante réceptrice, le pétitionnaire indique que des études rapportent que le pollen de maïs se dépose principalement à faibles distances, avec de très faibles taux de dispersion au-delà de 30 à 50 mètres. Le pétitionnaire indique également l'absence d'espèces végétales sauvages endogènes ou indigènes sexuellement compatibles avec le maïs dans l'Union européenne.

Le GT « Biotechnologie » note néanmoins que certaines études ont montré la possibilité de flux de gènes à longue distance, en particulier selon la direction des vents dominants et lorsque la surface du champ de maïs d'origine est importante (Lu, 2019). La distance maximale rapportée dans la littérature pour le flux de gènes par pollen entre parcelles de maïs est de 4,45 km (Hofmann, 2014). Par ailleurs, le GT rappelle que la téosinte (*Zea mays ssp mexicana*) est une espèce végétale adventice, sexuellement compatible avec le maïs, présente en Europe (Espagne, France).

Le GT « Biotechnologie » considère que le pétitionnaire doit prendre en compte la littérature scientifique disponible concernant les conditions d'occurrence de flux de gènes à longue distance du maïs, ainsi que l'existence de populations de téosintes dans l'Union européenne afin d'analyser la possibilité d'introgession de gènes de maïs dans la téosinte.

B.1.2. Caractérisation moléculaire

B.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique du maïs a été réalisée par une méthode d'intégration site-spécifique (SSI, *site-specific integration*) qui comporte deux grandes étapes successives, à savoir 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 une technologie dite SbS (*Southern-by-Sequencing*) afin de s'assurer de l'identité des séquences du maïs DP910521 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 : PHP71012, PHP70594, PHP21139 et PHP21875.

Le plasmide PHP71012 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de réplication et séquences nécessaires à la construction du plasmide)
- entre les bordures droite et gauche d'un ADN-T, **la cassette du site d'intégration spécifique** :
 - les séquences zm-SEQ138 et zm-SEQ139 qui encadrent la cassette de SSI et qui correspondent à des séquences de maïs. Ces séquences permettent la recombinaison homologue médiée par le système CRISPR/Cas9 et conduisent à l'insertion du site d'intégration spécifique ;
 - un site *loxP*, site de recombinaison du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinaison Cre ;
 - le promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et ses séquences régulatrices ;
 - le site FRT1, cible de recombinaison pour la recombinaison FLP de *Saccharomyces cerevisiae* ;
 - le gène de la néomycine phosphotransférase II (gène *nptII*) du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* ;
 - le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum*,
 - le site FRT87, cible de recombinaison pour la recombinaison FLP de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le plasmide PHP70594 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de réplication et séquences nécessaires à la construction du plasmide)
- **les éléments utiles pour la recombinaison par nucléase dirigée et non destinés à une insertion dans le génome du maïs** :
 - 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, dérivé de *Streptococcus pyogenes* ;
 - l'intron du gène *LS1* de *Solanum tuberosum* ;
 - l'exon 2 du gène de l'endonucléase Cas9, dérivé de *Streptococcus pyogenes* ;
 - 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 poIII* ;
 - l'ARN guide pour diriger l'endonucléase Cas9 pour une localisation ciblée, *zm-84CR1* ;
 - la séquence terminatrice du gène de maïs *zm-U6 poIII*.

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 PHP71012 contenant les séquences du site d'intégration spécifique, les séquences des 3 autres plasmides (PHP70594, PHP21139 et PHP21875) ne

sont pas destinées à s'intégrer dans le génome du maïs. Le plasmide PHP70594 porte la séquence du CRISPR⁴ utilisée comme ARN guide et les séquences codantes de l'enzyme associée (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-84CR1* 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 CRISPR *zm-84CR1* se fixe au niveau des séquences d'ADN cibles *zm-SEQ138* et *zm-SEQ139* localisées sur le chromosome 1 du maïs. L'endonucléase Cas9 liée à l'ARN guide induit une coupure du double brin de l'ADN spécifiquement sur ces sites. La recombinaison homologue avec les séquences cibles *zm-SEQ138* et *zm-SEQ139*, également présentes dans le plasmide PHP71012, permet l'insertion de la cassette du site d'intégration spécifique dans le chromosome 1 du 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 uniquement le site d'intégration spécifique grâce à leur caractérisation par SbS.

La **seconde transformation génétique** a été faite par bombardement de microprojectiles sur des tissus de maïs ayant subi la première transformation dans le but d'introduire quatre plasmides : PHP79620, PHP5096, PHP21875 et PHP73572. Cette seconde étape vise à insérer une partie de l'ADN-T du plasmide PHP79620 dans le site d'intégration spécifique au niveau des sites de recombinaison pour la recombinaison FLP.

Le plasmide PHP79620 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, **les cassettes des trois gènes d'intérêt destinées à être intégrées dans le génome de la plante :**
 - le site FRT1, cible de recombinaison pour la recombinaison FLP de *Saccharomyces cerevisiae* ;
 - **le gène *pmi* codant la phosphomannose isomérase d'*Escherichia coli*,**
 - le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum* ;
 - le terminateur de gène de la zéine du maïs ;
 - le promoteur et l'intron du gène de l'actine d'*Oryza sativa* ;
 - **le gène *mo-pat* codant la phosphinothricine acétyltransférase, issu de *Streptomyces viridochromogenes* et optimisé pour son expression dans le maïs ;**
 - le terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ;
 - un site *loxP*, site de recombinaison du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinaison Cre ;
 - les terminateurs des gènes de l'ubiquitine et de la γ -kafarine de *Sorghum bicolor* ;

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

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

- le site de recombinaison de l'intégrase lambda de bactériophage attB1 ;
- deux enhanceurs du virus de la mosaïque de *Mirabilis* ;
- un promoteur du virus associé à la distorsion des feuilles de lamier ;
- l'intron du gène du facteur d'initiation 6 du maïs ;
- la région 5' UTR du gène de l'extensine du maïs ;
- **le gène chimérique *cry1B.34* codant une protéine insecticide, composé de séquences dérivées des gènes *cry1B-class*, *cry1Ca1* et *cry9Db1* de *Bacillus thuringiensis* ;**
- le terminateur du gène de l'ubiquitine de *Oryza sativa* ;
- le site de recombinaison de l'intégrase lambda de bactériophage attB3 ;
- le site FRT87, cible de recombinaison pour la recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le plasmide PHP5096 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de réplication et séquences nécessaires à la construction du plasmide) et
- **les éléments utiles pour la recombinaison au niveau du site spécifique d'insertion et non destinés à une insertion dans le génome du maïs :**
 - le promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et ses séquences régulatrices ;
 - le gène *mo-flp*, codant la protéine FLP de *Saccharomyces cerevisiae*, et optimisé pour son expression dans le maïs ;
 - le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum*.

Le plasmide PHP21875 est identique à celui utilisé pour la première transformation, et la cassette d'expression présente dans le plasmide PHP73572 contient, tout comme le plasmide PHP21139 utilisé pour la première transformation, la séquence codante du gène *Wuschel 2* de maïs (*zm-wus2*).

Seule la séquence de l'ADN-T contenu dans le plasmide PHP79620 est destinée à être intégrée dans le génome du maïs.

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 *np11* présente suite à la première étape de transformation génétique. L'expression transitoire de la recombinase FLP était nécessaire pour pouvoir réaliser cette recombinaison homologue, et les expressions transitoires 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, mais 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. La présence des séquences insérées souhaitées et l'absence de séquences des différents squelettes plasmidiques ont été démontrées dans des plantes de génération T1 par SbS.

B.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du maïs DP910521 (génération T1) ont été caractérisés par NGS selon la technologie SbS en utilisant pour témoins le maïs isogénique PH184C et les 7 plasmides utilisés pour les transformations génétiques. Le pétitionnaire indique une insertion unique des séquences génétiques attendues dans le chromosome 1 du maïs. Aucune séquence en dehors de celles souhaitées provenant des plasmides PHP71012 et PHP79620 n'a été identifiée.

Le séquençage ciblé des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (1097 pb en 5' et 1054 pb en 3') ainsi que de l'insert complet pour le maïs DP910521 et de la région génomique correspondante pour le témoin PH184C a été réalisé par méthode Sanger. Le pétitionnaire indique une identité de séquences avec les séquences attendues provenant du plasmide PHP71012 au niveau des sites d'insertion, l'absence de délétion dans le génome du maïs, et l'absence de séquences en dehors de celles attendues suite aux deux transformations. 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.

Le maïs DP910521 a été cultivé sur 6 sites (5 aux Etats-Unis et 1 au Canada) en 2019, avec ou sans traitement au glufosinate-ammonium pour le maïs génétiquement modifié. Les teneurs en protéines PAT, PMI et Cry1B.34 ont été quantifiées par des tests ELISA dans différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles, pollen, fourrage et grains) et à différents stades de développement de l'hybride F1 (PH47K2/PH184C). Après ajustement avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine, les teneurs moyennes les plus élevées dans le maïs DP910521, respectivement non traité ou traité au glufosinate-ammonium sont rencontrées dans les feuilles pour l'ensemble des protéines nouvellement exprimées : 1079 et 1066 ng/mg de matière sèche pour la protéine Cry1B.34, 128 et 116 ng/mg de matière sèche pour la protéine PAT, 43 et 41 ng/mg de matière sèche pour la protéine PMI. Le tableau 1 présente les teneurs en protéines Cry1B.34, PAT et PMI mesurées dans les grains et le fourrage selon les conditions.

Tableau 1 : Teneurs en protéines exogènes ajustées avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine, dans le fourrage et les grains de maïs DP910521 traité ou non avec du glufosinate-ammonium (exprimées en ng/mg de matière sèche).

| | | Protéine exogène | Cry1B.34 | PAT | PMI |
|----------|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Grains | <i>Maïs non traité</i> | Moyenne (gamme) | 7,7 (2,3-15,5) | 10,6 (5,4-18,1) | 6,1 (2,7-10,2) |
| | <i>Maïs traité</i> | Moyenne (gamme) | 8,6 (2,5-18,3) | 11,7 (6,1-19,1) | 6,2 (3,9-10,2) |
| Fourrage | <i>Maïs non traité</i> | Moyenne (gamme) | 325 (143-519) | 88 (38-175) | 18 (11-37) |
| | <i>Maïs traité</i> | Moyenne (gamme) | 286 (182-390) | 89 (48-200) | 20 (14-48) |

Les niveaux d'expression des protéines Cry1B.34, PAT et PMI 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 DP910521 a été confirmée par Southern blot sur cinq générations (T1 à T5). Le pétitionnaire indique que l'insertion est stable. L'analyse de ségrégation de l'insert réalisée par PCR quantitative sur 5 générations (F1, F2, T2, T3 et 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.

B.1.2.3. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Sur la base des éléments présentés par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » considère que la caractérisation moléculaire du maïs DP910521 ne soulève pas de question particulière dans le cadre de cette demande d'autorisation de mise sur le marché.

B.1.3. Evaluation comparative

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

Le maïs DP910521 est comparé à l'hybride F1 témoin isogénique. Ces deux maïs ont pour fond génétique PH47K2/PH184C. Leurs semences ont été produites en conditions similaires en 2019 à Porto-Rico. Le pétitionnaire utilise, de plus, vingt variétés hybrides commerciales non génétiquement modifiées comme variétés de référence dans les essais.

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

Le maïs DP910521, l'hybride témoin isogénique et les variétés de référence (quatre variétés par site) ont été cultivés en 2020 sur 12 sites (10 aux Etats-Unis et 2 au Canada). Ces sites expérimentaux sont indiqués par le pétitionnaire comme représentatifs de la production de maïs aux Etats-Unis et au Canada. Chaque modalité (variété 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 de l'EFSA (EFSA, 2011a ; EFSA, 2015).

Des échantillons de grains et de fourrage ont été récoltés sur les 12 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 12 (7 sites aux Etats-Unis et 1 site au Canada). 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.

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par l'EFSA (EFSA, 2010a). Les interactions génotype/site sont également analysées.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par l'EFSA (EFSA, 2010a), 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.

Néanmoins, si le pétitionnaire indique avoir réalisé les analyses statistiques selon les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010a), les niveaux d'erreur des tests de différence et d'équivalence retenus ne sont pas indiqués explicitement.

Le GT « Biotechnologie » demande que les niveaux d'erreur des tests de différence et d'équivalence retenus pour l'analyse comparative du maïs DP910521 soient précisés.

B.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 (OCDE, 2002a).

Le GT « Biotechnologie » estime que le matériel (grains et fourrage) et les composés analysés sont conformes au document consensus de l'OCDE (OCDE, 2002a).

B.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les résultats obtenus pour 72 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 fourrages de maïs DP910521 traité ou non avec du glufosinate-ammonium sont équivalents aux fourrages des variétés commerciales de référence. Les grains de maïs DP910521 traité ou non au glufosinate-ammonium présentent trois observations de catégorie IV / type 7⁶, pour les teneurs en acide arachidique (C20:0), acide éicosénoïque (C20:1) et acide béhénique (C22:0). Les grains de maïs DP910521 non traité au glufosinate-ammonium présentent de plus, deux observations de catégorie III, une de type 5⁷ pour la teneur en tryptophane et une de type 6⁸ pour la teneur en fer.

Le pétitionnaire indique, de plus, avoir analysé la signification biologique des différences ou non-équivalences des différents composés vis-à-vis d'intervalles de tolérance qu'il a établi avec une base de données de composition interne à l'entreprise. Ces données ont été obtenues avec les compositions de maïs de référence non génétiquement modifiés présents dans les différents essais réalisés (essais multi-années et multi-sites). Le pétitionnaire indique

⁶ Non équivalence avec les variétés de référence et différence avec la variété isogénique.

⁷ Non équivalence probable avec les variétés de référence et non différence avec la variété isogénique.

⁸ Non équivalence probable avec les variétés de référence et différence avec la variété isogénique.

que l'établissement de ces intervalles de tolérance est décrit dans le rapport nommé « PHI-R015-Y21 ». Cependant, ce rapport est absent dans le dossier. Le pétitionnaire indique que les teneurs pour lesquelles des « non-équivalences » ou « non-équivalences probables » avec les variétés commerciales de référence sont observées sont toutes comprises dans la gamme des mesures réalisées pour les variétés de référence de l'étude et dans les intervalles de tolérance construits à partir de l'étude sur la base de données interne du pétitionnaire. Le GT « Biotechnologie » rappelle par ailleurs qu'une simple inclusion des valeurs observées pour le maïs transformé dans la gamme des valeurs des variétés commerciales ne suffit pas à démontrer une équivalence biologique.

Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture du rapport PHI-R015-Y21 cité dans le cadre de l'analyse comparative de composition.

B.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Pour les 12 sites d'expérimentation, les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 11 paramètres dont 9 sont utilisables pour les analyses statistiques. Le maïs DP910521 est équivalent aux variétés commerciales de référence pour l'ensemble des paramètres analysés.

B.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs DP910521 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

B.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier initial, le GT « Biotechnologie » conclut que le maïs DP910521 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence sur le plan agronomique et phénotypique. Concernant la composition des grains et du fourrage, le GT considère que le rapport « PHI-R015-Y21 » précisant l'établissement des intervalles de tolérance utilisés pour l'analyse de la signification biologique des différences doit être fourni afin de pouvoir conclure.

B.1.4. Toxicologie

B.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Pour la protéine Cry1B.34, le pétitionnaire présente une étude de toxicité aiguë chez la souris CD1 (6 souris par sexe) par gavage à la dose limite de 5000 mg/kg de poids corporel (p.c.) réalisée en 2020, selon la ligne directrice OCDE 423 (OCDE, 2002b), ainsi qu'une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez la souris CD1 (10 souris par sexe) menée avec 2 doses de 300 et 1000 mg/kg p.c./ jour, selon la ligne directrice OCDE 407 (OCDE, 2008) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Les données de l'étude de toxicité par gavage répété avec la protéine Cry1B.34 pendant 28 jours montrent que les poids moyens des glandes surrénales (poids absolus, poids relatifs par rapport au poids corporel en fin d'étude et poids relatifs par rapport au poids du cerveau) sont statistiquement plus élevés chez les souris femelles ayant reçu la protéine Cry1B.34 à faible comme à forte dose, par rapport aux souris contrôles. Pour le groupe de souris femelles ayant reçu la protéine Cry1B.34 à faible dose, les valeurs présentées par le pétitionnaire sont proches des valeurs maximales des données historiques du centre investigateur. Ces effets ne sont pas observés chez les souris mâles.

Considérant que l'effet observé sur une glande endocrine peut être dépendant du sexe et intervenir à partir de faibles doses, le GT « Biotechnologie » estime que ces observations peuvent aussi être révélatrices d'un dysfonctionnement hormonal. Ainsi, le GT demande que ces résultats soient complétés par des dosages des glucocorticoïdes des souris mâles et femelles afin d'évaluer une éventuelle atteinte du système endocrinien. Dans ce contexte, le GT recommande que des doses inférieures à 300 mg/kg p.c./jour de la protéine Cry1B.34 soient testées dans une nouvelle étude de toxicité par gavage pendant 28 jours chez le rongeur.

Concernant les protéines PAT et PMI, le pétitionnaire indique que les protéines présentes dans le maïs DP910521 sont semblables à des protéines présentes dans d'autres plantes génétiquement modifiées ayant déjà fait l'objet d'autorisation de mise sur le marché. En conséquence, le pétitionnaire renvoie aux évaluations antérieures réalisées par l'EFSA sur ces plantes, aux données bibliographiques associées, et à un historique de consommation sûre. Aucune étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les protéines PAT et PMI n'est disponible.

Les données de sécurité sur les organismes sources, les recherches bioinformatiques d'homologies de séquences entre les protéines Cry1B.34, PAT et PMI et des séquences d'allergènes et de toxines connus, la dégradabilité de ces protéines par les enzymes digestives, la thermosensibilité de ces protéines et la teneur de ces protéines nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage ainsi que l'analyse faite par le GT « Biotechnologie » de ces données sont détaillées dans les sections sur l'allergénicité (section 1.5) et sur la caractérisation moléculaire de la plante génétiquement modifiée (section 1.2).

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines Cry1B.34, PAT et PMI.

Le GT « Biotechnologie » considère que l'analyse de la sécurité sanitaire liée à la consommation alimentaire des protéines nouvellement exprimées Cry1B.34, PAT et PMI doit être complétée par une analyse de leurs interactions potentielles.

B.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 Cry1B.34, PAT et PMI.

B.1.4.3. Informations sur les constituants modifiés des denrées alimentaires et des aliments pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux dérivés du maïs DP910521.

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

Une étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rongeur a été menée en 2021 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (OCDE, 2018) et en conformité avec les 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 DP910521,
- 33 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée DP910521 auxquels s'ajoutent 17 % de maïs isogénique non génétiquement modifié,
- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs isogénique non génétiquement modifié,
- 50 % (p/p) de grains moulus de 3 variétés commerciales non génétiquement modifiées, BK5833, P0843 et P0993.

Le maïs DP910521 utilisé dans cette étude a été traité avec du glufosinate-ammonium. 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 orale à dose répétée pendant 90 jours 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. Néanmoins, pour les tumeurs des glandes mammaires chez les jeunes rats femelles, les données de l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours, sont comparées à des données historiques issues des études réalisées entre 2008 et 2021 dans le centre investigateur ainsi que dans d'autres centres prestataires du pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » considère que les études sources des données historiques pour les tumeurs des glandes mammaires chez le rat doivent être limitées à celles issues du même centre investigateur, au cours des cinq dernières années.

De plus, le pétitionnaire s'appuie sur l'article de Hong *et al.* (Hong, 2017) pour justifier le nombre d'animaux par groupe, mais applique dans son analyse des données, une correction pour tests multiples (*false discovery rate*, FDR), non prise en compte dans le calcul de puissance.

Le GT « Biotechnologie » considère que ce type de calcul surestime la puissance de l'étude (van der Voet, 2018) et le considère donc comme non recevable. Le GT considère qu'une analyse des résultats avec et sans correction FDR doit être fournie, ainsi qu'un

nouveau calcul de puissance de l'étude de toxicité subchronique chez le rat, prenant en compte la correction pour tests multiples.

B.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Le GT « Biotechnologie » considère que l'étude de toxicité de la protéine Cry1B.34 par gavage réitéré pendant 28 jours chez la souris doit être complétée par des dosages des glucocorticoïdes des souris mâles et femelles afin d'évaluer l'éventuelle atteinte du système endocrinien, et qu'une analyse des interactions potentielles entre les trois protéines nouvellement exprimées PAT, PMI, Cry1B.34 doit être conduite par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » n'est de plus pas en mesure de se prononcer sur la sécurité sanitaire liée à la consommation alimentaire du maïs DP910521 sur la base de l'étude de toxicité subchronique orale à dose répétée pendant 90 jours présentée dans le dossier, en raison du calcul de puissance considéré comme non valide et de la comparaison des données pour les tumeurs des glandes mammaires chez les rats femelles à des données historiques provenant de plusieurs centres investigateurs et sur une période supérieure à cinq ans.

B.1.5. Evaluation de l'allergénicité

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

Le potentiel allergénique des trois protéines nouvellement exprimées dans le maïs DP910521 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (EFSA, 2017), à savoir :

- l'innocuité des sources de protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée ;
- l'absence d'homologies de séquences entre ces protéines et des allergènes ou toxines connus lorsque la recherche est effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus ;
- la dégradation des protéines exprimées par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées ;
- la thermorésistance des protéines exprimées ;
- la faible teneur en protéines nouvellement exprimées dans les grains de la plante génétiquement modifiée.

Les sources des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée sont *Bacillus thuringiensis* pour Cry1B.34, *Streptomyces viridochromogenes* pour PAT, *Escherichia coli* souche K-12 pour PMI. 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 Cry1B.34, protéine chimérique n'ayant encore jamais été utilisée dans la transformation de plantes génétiquement modifiées, a fait l'objet d'une étude complète spécifique.

La protéine Cry1B.34 utilisée pour les différentes études a été produite dans une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli*. La protéine Cry1B.34 est rapidement dégradée en conditions de protéolyse digestive simulée *in vitro*. La stabilité thermique de la protéine Cry1B.34 a été déterminée en recherchant son activité biologique contre des larves de *Spodoptera frugiperda* 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 Cry1B.34 est montrée suite à un chauffage supérieur à 75 °C pendant 30 min.

Etant donné les quantités importantes de protéine Cry1B.34 synthétisées dans les feuilles du maïs génétiquement modifié DP910521 et les faibles quantités nécessaires pour la réalisation des tests de dégradation *in vitro* et de résistance à la chaleur, **le GT « Biotechnologie » demande que la protéine extraite de la plante génétiquement modifiée soit utilisée pour la réalisation de ces tests, conformément aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2017).**

L'analyse bioinformatique des ORF potentiels au niveau des jonctions et de l'insert dans le maïs DP910521 permet au pétitionnaire d'identifier 7 ORFs dont les protéines putatives correspondantes présentent un pourcentage d'identités de séquences globales > 35 % avec des allergènes de la base COMPARE (version 2021). Ces identités 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. Le GT « Biotechnologie » estime que ces identités de séquences paraissent fortuites et dépourvues de signification biologique.

La recherche d'identités de séquences entre les protéines Cry1B.34, PAT et PMI 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 Cry1B.34, PAT et PMI exprimées dans le maïs génétiquement modifié DP910521 ne présentent pas d'identités globales avec les allergènes de la banque AllergenOnline (version 2021). En revanche, 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 Cry1B.34, PAT et PMI et des toxines avérées ou des protéines adjuvantes confirmées.

La recherche de peptides immunotoxiques potentiels (« non IgE-mediated adverse immune reactions to foods », maladie cœliaque) 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 pour les deux autres, la séquence ELPF, et deux peptides de la protéine PAT possédant la séquence ELPF sont identifiés comme homologues du motif ELPY contenues dans 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.

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

Aucune information disponible ne laisse supposer que le maïs transgénique DP910521 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de maïs non génétiquement modifiées.

B.1.5.3. Propriété d'adjuvant

Aucune information disponible ne laisse supposer que les trois protéines nouvellement exprimées dans le maïs DP910521 puissent développer des propriétés adjuvantes.

B.1.5.4. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des données et des commentaires fournis par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » conclut que le potentiel allergénique des trois protéines Cry1B.34, PAT et PMI, nouvellement exprimées dans le maïs DP910521, peut être considéré comme très faible. Les trois protéines Cry1B.34, PAT et PMI n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes ni de propriétés immunotoxiques vis-à-vis de malades souffrant de maladie cœliaque. Néanmoins, le GT estime que la protéine Cry1B.34 extraite du maïs DP910521 aurait dû être utilisée pour les tests de digestibilité et de résistance à la chaleur, conformément aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2017), et non celle produite par une *E. coli* recombinante. Enfin, d'après les données disponibles, l'allergénicité du maïs DP910521 est probablement similaire à celle d'un maïs conventionnel.

B.1.6. Evaluation nutritionnelle

En 2021, le pétitionnaire a réalisé une évaluation nutritionnelle des grains de maïs DP910521, de la variété témoin isogénique et de trois variétés de référence non génétiquement modifiées dans l'alimentation de poulets de souche Ross 708. Le maïs DP910521 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.

Le maïs a été incorporé à des taux de 55 % dans les aliments de démarrage (0-21 jours), de 60 % dans les aliments de croissance (22-35 jours) et de 65 % 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 indique que l'analyse de composition des différents régimes n'a pas mis en évidence de différence entre les lots. Les paramètres de performance de croissance, de mortalité et de rendement en carcasse mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs DP910521 ne sont pas différents significativement de ceux qui sont mesurés sur les poulets nourris avec les grains de la variété témoin isogénique ou des variétés de référence.

Tout comme pour l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rat, le pétitionnaire applique dans son analyse des données une correction pour tests multiples (FDR), sans la prendre en compte dans son calcul de puissance. Le GT « Biotechnologie » considère que ce type de calcul surestime la puissance de l'étude (van der Voet, 2018) et considère donc ce calcul comme non recevable. Le GT considère qu'une analyse des résultats avec et sans correction FDR, ainsi qu'un nouveau calcul de puissance de l'étude nutritionnelle réalisée chez le poulet prenant en compte la correction pour tests multiples, devraient être réalisés.

B.2. Évaluation de l'exposition - Prévion de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au maïs DP910521 pour l'humain et l'animal.

Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2020 pour caractériser le maïs DP910521, après ajustement avec les pourcentages d'efficacité d'extraction pour chaque protéine (cf. B.1.2.2.). Pour les grains, le pétitionnaire indique également avoir calculé des teneurs par masse de matière fraîche, et indique des teneurs respectives en Cry1B.34, PAT et PMI de 7,2, 10 et 5,2 µg/g de matière fraîche.

L'estimation de la consommation journalière des protéines Cry1B.34, PAT et PMI par l'animal est fondée sur les données de l'OCDE (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 DP910521 et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré comme étant du maïs DP910521).

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

- chez les poulets de chair pour la consommation de grains (ingestion de 0,42 mg/kg p.c./jour pour Cry1B.34, de 0,59 mg/kg p.c./jour pour PAT et de 0,31 mg/kg p.c./jour pour PMI) ;
- chez les vaches laitières pour la consommation de fourrage (ingestion de 6,7 mg/kg p.c./jour pour Cry1B.34, de 2,1 mg/kg p.c./jour pour PAT et de 0,46 mg/kg p.c./jour pour PMI) ;

- chez les vaches laitières pour la consommation de fourrage et de grains (ingestion de 6,8 mg/kg p.c./jour pour Cry1B.34, de 2,2 mg/kg p.c./jour pour PAT et de 0,53 mg/kg p.c./jour pour PMI).

Le pétitionnaire a réalisé en 2022, une étude sur les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'humain aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI selon les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2019a) et en utilisant les données du fichier Excel pour le maïs mis à disposition sur le site de l'EFSA⁹ (accès le 1^{er} mars 2022). 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. Des hypothèses conservatives sont formulées par le pétitionnaire :

- tout le maïs consommé est du maïs DP910521 ;
- les procédés de transformation des aliments n'impactent pas les concentrations en protéines exogènes Cry1B.34, PAT et PMI qui restent identiques à celles présentes dans les grains ou le pollen de maïs DP910521.

Le pétitionnaire indique que :

- pour les forts consommateurs, l'exposition alimentaire aiguë estimée la plus élevée aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI résulte de la consommation du maïs DP910521 en Roumanie pour la classe d'âge « Autres enfants » (3 à 9 ans) avec respectivement, des estimations de consommation de 109,415, 151,966 et 79,022 µg/kg p.c./jour ;
- pour les moyennes de consommation, l'exposition alimentaire aiguë estimée aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI la plus élevée est observée au Danemark pour la classe d'âge « Enfants en bas âge » (12 à 35 mois), avec respectivement des estimations de consommation de 8,858, 12,303 et 6,397 µg/kg p.c./jour ;
- pour les forts consommateurs, l'exposition alimentaire chronique estimée aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI la plus élevée est observée à Chypre pour la classe d'âge « Nourrissons » (0 à 11 mois) avec des estimations de consommation respectivement de 58,792, 81,656 et 42,461 µg/kg p.c./jour ;
- pour les moyennes de consommation, l'exposition alimentaire chronique estimée aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI la plus élevée est observée au Danemark pour la classe d'âge « Enfants en bas âge » (12 à 35 mois), avec des estimations de consommation respectivement de 8,853, 12,296 et 6,394 µg/kg p.c./jour.

Concernant les compléments à base de pollen, les expositions aiguës les plus élevées aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI sont observées en France pour la classe d'âge des « Personnes âgées » (65 ans à 74 ans), avec des estimations respectivement de 0,174, 47,386 et 16,724 µg/kg p.c./jour. Les expositions chroniques estimées les plus élevées aux protéines Cry1B.34, PAT et PMI ont été enregistrées en France pour la classe d'âge « Personnes âgées » (65 à 74 ans), avec des estimations respectivement de 0,116, 31,590 et 11,150 µg/kg p.c./jour. Toutes les enquêtes rapportant une consommation chronique de compléments à base de pollen comptaient moins de cinq consommateurs.

Le GT « Biotechnologie » conclut que l'évaluation de l'exposition alimentaire au maïs DP910521 ne soulève pas de question particulière liée à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine.

⁹ <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>

B.3. Caractérisation des risques

Le pétitionnaire indique qu'il n'identifie pas de risques pour la santé animale ou pour la santé humaine.

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

Le pétitionnaire ne propose pas de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

B.5. Évaluation des risques pour l'environnement (ERA)

B.5.1. Introduction

Le pétitionnaire rappelle que la présente demande concerne l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs DP910521. La culture de ce maïs en Union Européenne est exclue de cette demande.

B.5.2. Approche globale de l'ERA

Les résultats de l'évaluation moléculaire, de l'évaluation comparative de la composition et des caractères agronomiques et phénotypiques et l'étude de la germination n'ont pas montré de différence biologique autre que les traits recherchés de résistance aux insectes liés à l'expression des protéines Cry1B.34 et de tolérance à la substance herbicide glufosinate-ammonium liés à l'expression de la protéine PAT. Les seuls dangers à considérer sont donc ceux liés à l'expression de ces deux protéines.

S'agissant d'un dossier de demande d'importation, l'exposition de l'environnement de l'Union européenne ne peut résulter selon le guide de l'EFSA que d'une dispersion accidentelle des grains importés, d'une exposition aux fèces d'animaux ayant consommé le maïs DP910521, ou aux produits issus de l'utilisation ou de la transformation de ce maïs.

B.5.3. Domaines spécifiques de risque

B.5.3.1. Persistance et caractère envahissant y compris le « flux de gènes » de plante à plante

Le pétitionnaire indique qu'il n'existe pas d'espèces sauvages indigènes sexuellement compatibles avec le maïs dans l'Union européenne, et qu'aucune hybridation croisée ou introgression n'est donc attendue.

Le GT « Biotechnologie » considère, en accord avec les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010b), que l'évaluation du risque de flux de gènes vers les seules espèces sauvages indigènes n'est pas suffisante et que les possibilités d'hybridation avec toute espèce apparentée sexuellement compatible doivent également être prises en compte.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire prenne en compte l'existence de populations de téosintes dans l'Union européenne et considère la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec les téosintes, *Zea mays ssp. mexicana* (EFSA, 2016 ; EFSA, 2022).

Le glufosinate-ammonium étant une substance herbicide interdite en agriculture dans l'Union Européenne, l'expression du gène PAT n'est pas susceptible de conférer un avantage sélectif à une plante.

Le pétitionnaire cite les insectes *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea grandiosella* et *Ostrinia nubilalis* comme espèces cibles de la protéine Cry1B.34. Cette dernière espèce est présente en Europe. L'expression du gène Cry1B.34 dans des téosintes ou des plantes de maïs férales, suite à une transmission des gènes par flux de pollen depuis des plantes de maïs DP910521 issues de grains dispersés accidentellement, est donc susceptible de conférer un avantage sélectif à ces populations. Le potentiel avantage sélectif de résistance à des insectes cibles n'est pas abordé par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse le risque lié à un potentiel avantage sélectif conféré à des plantes de maïs férales ou à des téosintes suite à un flux de gènes du maïs DP910521, en lien avec les données de la littérature sur le statut et la distribution géographique des populations d'insectes cibles.

B.5.3.2. Transfert de gènes de la plante à des micro-organismes

Concernant le risque de transfert de gènes à des micro-organismes, le pétitionnaire fournit des études bio-informatiques démontrant l'absence d'ADN inséré chez le maïs et homologue à celui de bactéries capable de permettre une recombinaison homologue, à l'exception de celle attendue pour le gène *pmi*, issu de *E. coli*. Dans le cas où une recombinaison pourrait se produire, sa stabilisation serait uniquement possible après une forte pression de sélection. Dans ce contexte, aucun avantage sélectif n'est attendu pour les micro-organismes accueillant des séquences transgéniques du maïs DP910521.

Le GT « Biotechnologie » estime que le risque de transfert vers les micro-organismes est négligeable et non préoccupant.

5.3.3. Interactions de la plante génétiquement modifiée avec les organismes cibles

Puisque la culture du maïs DP910521 est exclue de la demande d'autorisation de mise sur le marché, le pétitionnaire indique qu'une évaluation du développement potentiel de la résistance des organismes cibles à la protéine Cry1B.34 n'est pas nécessaire en raison d'une exposition négligeable escomptée dans l'Union européenne dans le seul cadre d'importations. De plus, le pétitionnaire indique trois espèces de lépidoptères comme organismes cibles mais présente un bioessai sur *Spodoptera frugiperda* seulement, test destiné à identifier la température d'inactivation de la protéine Cry1B.34.

Le GT « Biotechnologie » considère cependant, en accord avec les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010b), que l'étape de caractérisation des dangers est indépendante de l'étape de caractérisation de l'exposition à ce danger.

Le GT « Biotechnologie » demande que le mode et le spectre d'action de la protéine insecticide Cry1B.34 soient analysés afin d'identifier expérimentalement les organismes cibles pour lesquels le maïs DP910521 pourrait présenter une résistance. En complément, le GT estime que l'intérêt du développement d'une protéine chimérique doit être justifié.

Le pétitionnaire ne se réfère qu'à une importation dans les régions de l'Union européenne de climat tempéré. Le GT « Biotechnologie » rappelle cependant que l'organisme cible de la protéine insecticide Cry1B.34, *Spodoptera frugiperda* est présent à Mayotte et à La Réunion ; de même, *Ostrinia nubilalis*, lépidoptère ravageur indiqué comme cible de cette même protéine par le pétitionnaire, est largement répandu en Europe. Le développement d'une résistance de ces lépidoptères à la protéine Cry1B.34 pourraient théoriquement avoir des conséquences sur les stratégies de lutte contre ces espèces à long terme en Union européenne et dans ses régions ultrapériphériques.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse les régions ultrapériphériques de l'Union européenne et qu'il évalue les conséquences potentielles du développement d'une résistance à la protéine insecticide Cry1B.34, en considérant toutes les espèces cibles et leurs aires de répartition.

5.3.4. Interactions de la plante génétiquement modifiée avec les organismes non-cibles

Le pétitionnaire prend en compte les trois scénarios d'exposition non intentionnelle recommandés par l'EFSA (EFSA, 2010b), à savoir :

- (i) un déversement accidentel de grains viables ;
- (ii) une exposition via les fèces d'animaux nourris avec le maïs DP910521 ;
- (iii) une exposition par le biais de matière organique végétale importée ou dérivée de l'utilisation du maïs DP910521.

Comme indiqué plus haut, le pétitionnaire ne considère cependant pas la possibilité d'introggression de gènes du maïs DP910521 dans la téosinte comme source potentielle d'exposition des organismes non-cibles. Enfin, le pétitionnaire indique que les protéines Cry1B.34, PAT et PMI sont présentes en quantité faible dans le grain, mais ne prend pas en compte le fourrage.

Le GT « Biotechnologie » rappelle que les aliments pour animaux issus du maïs DP910521 sont le grain et le fourrage, et que la teneur en protéine Cry1B.34 indiquée par le pétitionnaire est, pour le maïs DP910521 traité au glufosinate-ammonium, 36 fois supérieure dans le fourrage (220 ng/mg de masse sèche) que dans les grains (6,1 ng/mg de masse sèche).

Concernant la caractérisation des dangers pour les organismes non-cibles vis-à-vis du maïs DP910521, le GT « Biotechnologie » considère que le mode et le spectre d'action de la protéine insecticide Cry1B.34 doivent être analysés, en prenant en compte le

risque associé à un transfert de gènes vers les téosintes dans le cadre du scénario (i), et en prenant en compte le fourrage pour les scénarios (ii) et (iii).

5.3.5 Conclusions de l'évaluation des risques pour l'environnement

En raison notamment de l'absence de prise en compte des téosintes, et de l'absence d'analyse du mode et du spectre d'action de la protéine Cry1B.34, le GT « Biotechnologie » estime ne pas pouvoir conclure quant aux risques pour l'environnement liés à l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs DP910521.

B.6. Plan de surveillance des effets sur l'environnement consécutive à la mise sur le marché

Les risques d'effets indésirables potentiels sur la santé humaine et animale ou l'environnement étant négligeables dans le contexte des utilisations prévues du maïs DP910521, le pétitionnaire estime qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une surveillance spécifique. **Le GT « Biotechnologie » estime par ailleurs que le plan de surveillance générale exposé dans le dossier est conforme aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2011b).**

B.7. Informations complémentaires sur l'innocuité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifiés

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2012-2022. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2019b) pour procéder à cette revue systématique de la littérature. Les quatre bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du maïs DP910521.

Néanmoins, le pétitionnaire, dans la requête effectuée pour la revue systématique de la littérature scientifique, considère la protéine chimérique Cry1B.34 mais ne prend pas en compte les protéines Cry1B-class, Cry1Ca1 et Cry9Db1 desquelles sont issues les différentes régions de la protéine chimérique.

Le GT « Biotechnologie » considère que la requête de la littérature scientifique devrait être complétée en ajoutant les protéines Cry desquelles sont issues les différentes régions de la protéine chimérique Cry1B.34 (Cry1B-class, Cry1Ca1 et Cry9Db1), et que la sélection des articles ne soit pas limitée au seul maïs DP910521.

C. Conclusions du groupe de travail « Biotechnologie »

Dans la mesure où :

- **l'analyse de l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rat avec un aliment contenant du maïs DP910521 n'est pas jugée recevable par le GT ;**

- l'analyse de l'étude de toxicité par gavage réitéré pendant 28 jours chez la souris devrait être complétée afin de pouvoir conclure sur l'éventualité d'un dysfonctionnement hormonal potentiel causé par la protéine Cry1B.34 ;
- une protéine Cry1B.34 produite par une *E. coli* recombinante est utilisée pour les tests de digestibilité et de résistance à la chaleur, alors que la quantité de protéine présente dans le maïs DP910521 est suffisante pour sa purification et utilisation dans ces études ;
- l'évaluation des risques environnementaux ne prend pas en compte la téosinte, et n'analyse pas le spectre et le mode d'action de la protéine Cry1B.34 ;

le « GT Biotechnologie » considère ne pas pouvoir se prononcer sur la sécurité sanitaire et environnementale du maïs DP910521.

Les commentaires émis par le GT « Biotechnologie » lors de la période de consultation de l'EFSA et relatifs à ces aspects sont disponibles en annexe de cet avis.

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 considère qu'en l'absence de certaines données déterminantes, il ne peut se prononcer sur les risques sanitaires et environnementaux relatifs à l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs DP910521.

Dans la mesure où des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier par le pétitionnaire à la demande de l'EFSA, le présent avis ne préjuge pas de conclusions finales qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu de ces nouvelles données.

Pr. Benoît VALLET

MOTS-CLÉS

OGM, PGM, maïs, DP910521, résistance, insectes, lépidoptères, tolérance, glufosinate-ammonium, PAT, PMI, Cry1B.34

GMO, GMP, DP910521, maize, resistance, insects, lepidoptera, glufosinate ammonium, tolerance, PAT, PMI, Cry1B.34.

BIBLIOGRAPHIE

EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal*, 8, 1250, 59 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8, 1879, 111 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance document on Selection of Comparators for the Risk Assessment of GM Plants. *EFSA Journal*, 9, 2149, 20pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011b. EFSA Panel on GMO; Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9, 2316, 40 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 13, 4128, 44 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2016. Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. *EFSA supporting publication*, 1094, 13pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2017. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 15, 4862, 49 pp.

EFSA (European Food Safety Authority), 2019a. Gomez Ruiz JA, Bresson J-L, Frenzel Tand Paoletti C, 2019. Statement on the human dietary exposure assessment to newly expressed proteins in GM foods. *EFSA Journal*, 17, 5802, 18 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2019b. Devos Y, Guajardo IM, Álvarez F and Glanville J, 2019. 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. *EFSA supporting publications*, 1614, 62pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Devos Y, Aiassa E, Muñoz-Guajardo I, Messéan A and Mullins E. Statement on the update of environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations of EFSA (2016) on EU teosinte. *EFSA Journal*, 20, 7228, 40 pp.

Hofmann F, Otto M, Wosniok W. 2014. Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation-results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). *Environmental Sciences Europe*, 26, 24.

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.

Lu J, Lu J, He L. 2019. Modeling and estimation of pollen-mediated gene flow at the landscape scale. *Ecological Indicators*, 106.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 2002a. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 2002b. Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 2008. Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 2013. Guidance document on residues in livestock. Series on pesticides No. 73.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 2018), Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE.

van der Voet H, 2018. Safety assessments and multiplicity adjustment: Comments on a recent paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2194.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n°1829/2003, du maïs génétiquement modifié DP910521 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et pour être résistant à certains lépidoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-174). Maisons-Alfort : Anses, 32 p.



Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

Commentaires de l'Anses à destination de la DGAI pour transmission à l'EFSA

concernant la 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 DP910521 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et pour être résistant à certains lépidoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM

Dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-174

1. Identification et caractérisation des dangers

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

Le pétitionnaire mentionne des études qui rapportent que le pollen de maïs se dépose principalement à de faibles distances, et à de très faibles taux de dispersion au-delà de 30 à 50 mètres.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses note néanmoins que certaines études ont montré la possibilité de flux de gènes par pollen à longue distance, en particulier selon la direction des vents dominants et lorsque la surface du champ de maïs d'origine est importante (Lu, 2019). La distance maximale rapportée dans la littérature pour le flux de gènes par pollen entre parcelles de maïs est de 4,45 km (Hofmann, 2014).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire prenne en compte la littérature scientifique disponible concernant les conditions d'occurrence de flux de gènes par pollen à longue distance du maïs.

Le pétitionnaire mentionne l'absence d'espèces végétales sauvages endogènes ou indigènes sexuellement compatibles avec le maïs dans l'Union européenne.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses rappelle que la téosinte (*Zea mays ssp mexicana*) est une espèce végétale adventice, sexuellement compatible avec le maïs, présente en Europe.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire prenne en compte l'existence de populations de téosintes adventices dans l'Union européenne et analyse la possibilité d'introgression de gènes du maïs DP910521 dans la téosinte, documentée dans la littérature scientifique.

1.2. Caractérisation moléculaire

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

1.3. Analyse comparative

1.3.1. Choix et description des matériels testés y compris l'arbre de sélection de la lignée génétiquement modifiée, conditions de production des graines, tests de germination des graines, information sur les variétés de référence

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

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

Dans le cadre de l'analyse comparative, le pétitionnaire indique avoir réalisé les analyses statistiques selon les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010). Néanmoins, les niveaux d'erreur des tests de différence et d'équivalence retenus ne sont pas indiqués explicitement.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire précise les niveaux d'erreur des tests de différence et d'équivalence retenus pour l'analyse comparative du maïs DP910521.

1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.3.4. Analyse comparative de la composition

Dans l'analyse comparative de composition, le pétitionnaire indique avoir analysé la signification biologique des différences ou non-équivalences des différents composés vis-à-vis des intervalles de tolérance, établis avec une base de données de composition interne à l'entreprise. Ces données ont été obtenues avec les compositions de maïs de référence non génétiquement modifiés présents dans les différents essais réalisés (essais multi-années et multi-sites). Le pétitionnaire indique que l'établissement de ces intervalles de tolérance est décrit dans le rapport nommé « PHI-R015-Y21 », absent dans le dossier.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire fournisse le rapport PHI-R015-Y21 cité dans le cadre de l'analyse comparative de composition.

1.3.5. à 1.3.6.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses renvoie aux conclusions partielles des sections du §1.3 concernant l'évaluation comparative.

1.4. Toxicologie

1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Les données de l'étude de toxicité par gavage de souris avec la protéine Cry1B.34 pendant 28 jours montrent que les poids moyens de leurs glandes surrénales (poids absolus, poids relatifs par rapport au poids corporel en fin d'étude et poids relatifs par rapport au poids du cerveau) sont statistiquement plus élevés chez les souris femelles ayant reçu la protéine Cry1B.34 (à faible comme à forte dose). Pour le groupe de souris femelles ayant reçu la protéine Cry1B.34 à faible dose, les valeurs présentées par le pétitionnaire sont proches des valeurs maximales des données historiques du centre investigateur. Ces effets ne sont pas observés chez les souris mâles.

Toutefois, le GT « Biotechnologie » de l'Anses rappelle qu'un effet sur une glande endocrine peut être sexe dépendant, intervenir à faibles doses et considère que ces observations peuvent être révélatrices d'un dysfonctionnement hormonal.

Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire complète ces résultats par des dosages des glucocorticoïdes des souris mâles et femelles afin d'évaluer l'atteinte éventuelle du système endocrinien des souris dans cette étude. Dans ce contexte, le GT « Biotechnologie » de l'Anses recommande que des doses inférieures à 300 mg/kg p.c./jour de la protéine Cry1B.34 soient également testées dans une nouvelle étude de toxicité pendant 28 jours chez le rongeur.

De plus, le pétitionnaire n'apporte aucune indication sur les interactions protéiques potentielles entre Cry1B.34, PAT et PMI.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire complète son analyse de la sécurité des trois protéines nouvellement exprimées par une analyse de leurs interactions potentielles.

1.4.2. à 1.4.3.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

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

Pour l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat, le pétitionnaire s'appuie sur l'article de Hong *et al.* (Hong, 2017) pour le calcul de puissance réalisé. Cependant, le pétitionnaire applique dans son analyse des données une correction pour tests multiples (*false discovery rate*, FDR), sans la prendre en compte dans son calcul de puissance.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses estime que ce type de calcul conduit à une diminution de la puissance réelle de l'étude (van der Voet, 2018), et le considère donc comme non recevable.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire réalise une analyse des résultats avec et sans correction FDR, ainsi qu'un nouveau calcul de puissance de l'étude de toxicité subchronique chez le rat, prenant en compte la correction pour tests multiples.

Les données de l'étude de toxicité subchronique, pour les tumeurs des glandes mammaires chez les jeunes rats femelles, sont comparées à des données historiques issues des études réalisées entre 2008 et 2021 dans le centre investigateur ainsi que dans d'autres centres prestataires du pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire limite les études sources des données historiques pour les tumeurs des glandes mammaires chez le rat, à celles issues du même centre investigateur, au cours des cinq dernières années.

1.4.5. Conclusion de l'évaluation toxicologique

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses renvoie aux conclusions des sections du §1.4 concernant l'évaluation toxicologique.

1.5. Évaluation de l'allergénicité

1.5.1. Évaluation de l'allergénicité des protéines nouvellement exprimées

Pour la réalisation des essais de dégradation *in vitro* de la protéine Cry1B.34 par la pepsine et la trypsine et pour les essais de résistance à la chaleur, le pétitionnaire utilise la protéine Cry1B.34 produite dans une souche recombinante d'*E. coli*.

Etant donné les quantités importantes de protéine Cry1B.34 synthétisées dans les feuilles du maïs génétiquement modifié DP910521 et les faibles quantités nécessaires pour la réalisation des tests de dégradation *in vitro* et de résistance à la chaleur, le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que la protéine extraite de la plante aurait pu être utilisée, conformément aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2017).

Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire réalise un test de dégradation *in vitro* de la protéine Cry1B.34 extraite du maïs DP910521 par la pepsine et la trypsine, ainsi qu'un test de résistance à la chaleur de cette protéine.

1.5.2. à 1.5.3.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.5.4. Conclusion de l'évaluation de l'allergénicité

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses renvoie aux conclusions des sections du §1.5 concernant l'évaluation de l'allergénicité.

1.6. Évaluation nutritionnelle

1.6.1. Évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires génétiquement modifiées

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

1.6.2. Évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux génétiquement modifiés

Pour l'étude nutritionnelle réalisée chez le poulet, le pétitionnaire applique dans son analyse des données une correction pour tests multiples (FDR), sans la prendre en compte dans son calcul de puissance.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses estime que ce type de calcul conduit à une diminution de la puissance réelle de l'étude (van der Voet, 2018), et le considère donc comme non recevable.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire réalise une analyse des résultats avec et sans correction FDR, ainsi qu'un nouveau calcul de puissance de l'étude nutritionnelle réalisée chez le poulet, prenant en compte la correction pour tests multiples.

1.6.3. Conclusions de l'évaluation nutritionnelle

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande de se référer à la conclusion de la section précédente concernant l'évaluation nutritionnelle.

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

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

3. Caractérisation des risques

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

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

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

5. Évaluation des risques pour l'environnement (ERE)

5.1. à 5.2.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

5.3. Domaines spécifiques de risque

5.3.1. Persistance et caractère envahissant y compris le « flux de gènes » de plante à plante

Le pétitionnaire indique qu'il n'existe pas d'espèces sauvages indigènes sexuellement compatibles avec le maïs dans l'Union européenne, et qu'aucune hybridation croisée ou introgression n'est donc attendue.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère, en accord avec les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010), que l'évaluation du risque de flux de gènes vers les seules espèces sauvages indigènes n'est pas suffisante, et que les possibilités d'hybridation avec toute espèce apparentée sexuellement compatible doivent également être prises en compte.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire prenne en compte l'existence de populations de téosintes adventices dans l'Union européenne et considère la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec les téosintes, *Zea mays ssp. mexicana* (EFSA, 2016 ; EFSA, 2022).

Le potentiel avantage sélectif, en termes de résistance à des insectes cibles, qui pourrait être conféré à des plantes de maïs férales ou à des téosintes adventices suite à un flux de gènes du maïs DP910521 n'est pas abordé par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse le risque lié à un potentiel avantage sélectif conféré à des plantes de maïs férales ou à des téosintes adventices suite à un flux de gènes du maïs DP910521, en lien avec les données de la littérature sur le statut et la distribution géographique des populations d'insectes cibles.

5.3.2. Transfert de gènes de plante à micro-organisme

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

5.3.3. Interactions de la plante génétiquement modifiée avec les organismes cibles

Le pétitionnaire considère, puisque la culture du maïs DP910521 est exclue de la demande d'autorisation de mise sur le marché, qu'une évaluation du développement potentiel de la résistance des organismes cibles à la protéine Cry1B.34 n'est pas nécessaire en raison d'une exposition négligeable escomptée dans l'Union européenne dans le cadre d'importation. De plus, le pétitionnaire indique trois espèces de lépidoptères comme organismes cible mais présente un bioessai sur *Spodoptera frugiperda* seulement, destiné à identifier la température d'inactivation de la protéine Cry1B.34.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère néanmoins, en accord avec les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010), que l'étape de caractérisation des dangers est indépendante de l'étape de caractérisation de l'exposition à ce danger.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le mode et le spectre d'action de la protéine insecticide Cry1B.34 soient analysés afin d'identifier expérimentalement les organismes cibles pour lesquels le maïs DP910521 pourrait présenter une résistance. En complément, le GT estime que l'intérêt du développement d'une protéine chimérique doit être justifié.

Le pétitionnaire ne se réfère qu'à une importation dans les régions de l'Union européenne de climat tempéré.

Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses note que l'organisme cible de la protéine insecticide Cry1B.34, *Spodoptera frugiperda* est présent à Mayotte et à La Réunion ; de même, *Ostrinia nubilalis*, lépidoptère ravageur indiqué comme cible de cette même protéine par le pétitionnaire, est largement répandu en Europe. Le développement d'une résistance de ces lépidoptères à la protéine Cry1B.34 pourraient théoriquement avoir des conséquences sur les stratégies de lutte contre ces espèces à long terme en Union européenne et ses régions ultrapériphériques.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire prenne en compte dans son analyse les régions ultrapériphériques de l'Union européenne et qu'il évalue les conséquences potentielles du développement d'une résistance à la protéine insecticide Cry1B.34, en considérant toutes les espèces cibles et leurs aires de répartition.

5.3.4. Interactions de la plante génétiquement modifiée avec les organismes non-cibles

Le pétitionnaire prend en compte les trois scénarios d'exposition non intentionnelle recommandés par l'EFSA (EFSA, 2010), à savoir (i) un déversement accidentel de grains viables, (ii) une exposition via les fèces d'animaux nourris avec le maïs DP910521, et (iii) une exposition par le biais de matière organique végétale importée ou dérivée de l'utilisation du maïs DP910521. Le pétitionnaire ne considère cependant pas la possibilité d'introgession de gènes du maïs DP910521 dans la téosinte comme source potentielle d'exposition des organismes non-cibles. Enfin, le pétitionnaire indique que les protéines Cry1B.34, PAT et PMI sont présentes en quantité faible dans le grain, et ne prend pas en compte le fourrage.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses rappelle toutefois que les aliments pour animaux issus du maïs DP910521 sont le grain et le fourrage, et que la teneur en protéine Cry1B.34 indiquée par le pétitionnaire est, pour le maïs DP910521 traité au glufosinate-ammonium, 36 fois supérieure dans le fourrage (220 ng/mg de masse sèche) que dans les grains (6,1 ng/mg de masse sèche).

Concernant la caractérisation des dangers des organismes non-cibles vis-à-vis du maïs DP910521, le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire décrive et analyse le mode et le spectre d'action de la protéine insecticide Cry1B.34, prenne en compte le risque associé à un transfert de gènes vers les téosintes dans le cadre du scénario (i), et prenne en compte le fourrage pour les scénarios (ii) et (iii).

5.3.5 à 5.3.7.

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

5.3.8. Evaluation globale du risque et conclusions

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande de se référer aux conclusions des sections précédentes concernant l'évaluation du risque environnemental.

6. Plan de surveillance des effets sur l'environnement

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

7. Informations complémentaires sur l'innocuité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifiés

7.1. Études publiées dans la littérature scientifique

Le pétitionnaire, dans la requête effectuée pour la revue systématique de la littérature scientifique, considère la protéine chimérique Cry1B.34 mais ne prend pas en compte les protéines Cry1B-class, Cry1Ca1 et Cry9Db1 desquelles sont issues les différentes régions de la protéine chimérique.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire ajoute dans la requête de la littérature scientifique les protéines desquelles sont issues les différentes régions de la protéine

Commentaires de l'Anses sur le dossier EFSA-GMO-NL-2022-174
Saisine n° 2023-SA-0021

chimérique Cry1B.34 (Cry1B-class, Cry1Ca1 et Cry9Db1), et qu'il ne limite pas la sélection des articles au seul maïs DP910521.

7.2. Autres informations complémentaires

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour cette section n'appellent pas de commentaire de la part du GT « Biotechnologie » de l'Anses.

Références

- EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal*, 8, 1250, 59 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8, 1879, 111 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2016. Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. *EFSA supporting publication*, 1094, 13pp.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2017. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 15, 4862, 49 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Devos Y, Aiassa E, Muñoz-Guajardo I, Messéan A and Mullins E. Statement on the update of environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations of EFSA (2016) on EU teosinte. *EFSA Journal*, 20, 7228, 40 pp.
- Hofmann F, Otto M, Wosniok W. 2014. Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation-results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). *Environmental Sciences Europe*, 26, 24.
- 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.
- Lu J, Lu J, He L. 2019. Modeling and estimation of pollen-mediated gene flow at the landscape scale. *Ecological Indicators*, 106.
- van der Voet H. 2018. Safety assessments and multiplicity adjustment: Comments on a recent paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2194.