

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 5 juillet 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 MON95379 développé pour être résistant à certains insectes (lépidoptères) pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-170)**

---

*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 15 avril 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 MON95379 développé pour être résistant à certains insectes (lépidoptères) pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-170).

#### **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 20-21 mai et les 17-18 juin 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 (FAOStat<sup>1</sup>), 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, FAOStat<sup>1</sup>) dont 31 % du maïs cultivé était génétiquement modifié (ISAAA<sup>2</sup>, 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, DIMBOA<sup>3</sup>, inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine, raffinose).

Le maïs MON95379 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7* codant respectivement les protéines *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7*. Ces deux protéines exogènes confèrent au maïs une résistance à certains lépidoptères.

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 MON95379. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce maïs venait à être importé, il devrait

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

<sup>2</sup> International service for the acquisition of agri-biotech applications

<sup>3</sup> 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one

satisfaisante 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 LH244.

#### **II.1.2. Caractérisation moléculaire**

##### **II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique**

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des embryons de maïs.

Des embryons immatures de maïs ont été récoltés après pollinisation et co-cultivés avec la souche AB1 d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, portant le vecteur PV-ZMIR522223 qui contient l'ADN-T. Aucun plasmide assistant (helper) ni ADN entraîneur (carrier) n'a été utilisé pour la transformation.

Après cette co-culture, les embryons ont été transférés sur milieu sélectif contenant de la carbénicilline (élimination des *A. tumefaciens* résiduelles) et du glyphosate (sélection des cellules végétales transformées). Les cals transformés ont ensuite été transférés sur milieu permettant l'initiation des racines et des pousses afin d'aboutir à la différenciation de plantules (plantes R0). La présence de l'ADN-T et l'absence de séquences du squelette plasmidique PV-ZMIR522223 ont été recherchées dans les plantes R1, par analyses PCR et Southern blot. Les plantes R1 homozygotes pour l'insertion ont ensuite été triées avec des caractérisations moléculaire et phénotypique plus complètes.

Les plantes R2 sélectionnées ont été croisées avec une autre lignée de maïs génétiquement modifié (GM). Cette seconde lignée de maïs GM a été développée également par transformation de la variété LH244 en utilisant le plasmide PV-ZM00513642 qui contient un ADN-T portant une cassette d'expression des séquences codantes d'une recombinase Cre. Les plantes F1 issues de ce croisement sont des maïs hybrides hétérozygotes pour les 2 ADN-T provenant chacun d'un des parents. L'expression de la recombinase Cre dans les plantes F1 conduit à une double cassure de l'ADN au niveau des sites cibles *loxP* et à l'excision de la cassette d'expression du gène *cp4epsps*. Les hybrides F1 sont autofécondés et les plantes F2 ne portant pas le gène *cre* sont conservées. Des autofécondations successives sont alors réalisées. Les plantes F4 sélectionnées sont les plantes homozygotes pour l'insert (séquences de l'ADN-T portant les gènes *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7* après excision de la cassette d'expression du gène *cp4epsps*) et ne portant pas d'autres séquences du plasmide PV-ZMIR522223 en dehors de cet ADN-T, ni de séquences du plasmide PV-ZM00513642. Les descendants ont ensuite fait l'objet de sélection sur leurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques pour retenir une lignée génétiquement modifiée MON95379.

Le plasmide PV-ZMIR522223 utilisé pour la transformation porte les cassettes d'expression des gènes d'intérêt, *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7*, et celle du gène *cp4 epsps* (marqueur de sélection), entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T. Le plasmide PV-ZM00513642 utilisé pour la transformation de la seconde lignée de maïs GM porte la cassette d'expression des séquences codantes de Cre, enzyme intervenant pour la génération de la lignée de maïs MON95379, et la cassette d'expression du gène *nptII* (néomycine phosphotransférase II) dont l'activité n'est pas utilisée. Ces deux cassettes d'expression sont entre les bordures gauche et droite d'un second ADN-T.

**Concernant l'ADN-T présent dans le plasmide PV-ZMIR522223 :**

La cassette d'expression du gène *Cry1B.868* est composée des éléments suivants, chacun séparé par des séquences intermédiaires :

- le promoteur, la région 5' non codante et le premier intron du gène de l'ubiquitine du téosinte mexicain (*Zea mays* subsp. *Mexicana*),
- la séquence codante des 3 domaines et du domaine C-terminal de la protéine chimérique *Cry1B.868* issue de différentes espèces de *Bacillus thuringiensis*,
- la région 3' non codante du gène de la protéine de transfert de lipides (LTP) du riz (*Oryza sativa*).

La cassette d'expression du gène *Cry1Da\_7* est composée des éléments suivants, chacun séparé par des séquences intermédiaires :

- la séquence de régulation de l'ARN 35S du virus « figwort mosaic virus » (FMV),
- le promoteur et la région 5' non codante du gène de la « tonoplast membrane integral protein » (Tip) du millet des oiseaux (*Setaria italica*),
- les séquences intronique et non codante du gène de l'actine 15 du riz (*Oryza sativa*),
- la séquence codante modifiée de la protoxine de la protéine *Cry1Da\_7* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*,
- la région 3' non codante du gène *GOS2* codant un facteur d'initiation de la traduction du riz (*Oryza sativa*).

La cassette d'expression du gène *cp4 epsps* est composée des éléments suivants, chacun séparé par des séquences intermédiaires :

- la séquence d'un site *loxP*, site de recombinaison du bactériophage P1 reconnu par la recombinase Cre,
- la séquence promotrice, la région 5' non codante et les séquences introniques du gène codant une alpha-tubuline (OSTubA) du riz (*Oryza sativa*),
- la séquence du gène *shkG* correspondant au peptide de localisation de la protéine EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* permettant l'adressage de la protéine CP4 EPSPS dans le chloroplaste,
- la séquence codante de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase d'*Agrobacterium* sp. souche CP4 (CP4 EPSPS),
- La région 3' non codante du gène codant une alpha-tubuline (OSTubA) du riz (*Oryza sativa*),
- la séquence d'un site *loxP*, site de recombinaison du bactériophage P1 reconnu par la recombinase Cre.

Le gène *cp4 epsps* code la protéine Cp4 EPSPS qui confère une tolérance au glyphosate aux plantes. Elle est utilisée comme marqueur de sélection pour les plantes régénérantes (R0, R1 et R2). Après croisement des plantes transformées de génération R2 avec une autre lignée de maïs GM exprimant une recombinase Cre, la cassette d'expression du gène *cp4 epsps* est excisée. Les séquences résiduelles de cette cassette présentes dans le maïs MON95379 correspondent à celles d'un site *loxP*. En conséquence, l'expression de la protéine CP4 EPSPS disparaît. Les maïs issus de la transformation (régénérants) sont tolérants au glyphosate mais les maïs hybrides à partir de la génération F1 et donc le maïs MON95379 ne le sont pas.

**Concernant l'ADN-T présent dans le plasmide PV-ZM00513642 :**

Les cassettes d'expression des gènes *Cre* et *nptII* sont présentes entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T. La protéine Cre permet la cassure double-brin de l'ADN et la recombinaison aux niveaux des sites *loxP* conduisant ici à l'excision de la cassette d'expression du gène *cp4 epsps*. La néomycine phosphotransférase II confère une tolérance à la néomycine et à la kanamycine mais elle n'est pas utilisée dans le schéma de développement de la lignée.

La cassette d'expression du gène *cre* est composée des éléments suivants, chacun séparé par des séquences intermédiaires :

- les séquences promotrice, leader, intronique et la région 5' non codante du gène de l'actine 1 du riz (*Oryza sativa*),
- la séquence codante partielle du premier exon du gène de la recombinaise Cre du bactériophage P1,
- la séquence du second intron d'un gène inductible par la lumière (LS1) de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*),
- la séquence codante partielle du second exon du gène de la recombinaise du bactériophage P1,
- la région 3' non codante de la protéine « heat shock », Hsp17, du blé tendre (*Triticum aestivum*).

La séquence codante du gène *nptII* du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* est placée sous le contrôle de séquences promotrices du transcrite 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus) et de la région 3' non codante de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* pTi.

L'insert présent dans le maïs GM exprimant la recombinaise Cre est présent sous forme hétérozygote dans les plantes hybrides F1. Après plusieurs générations et sélections des plantes, sont conservées les plantes portant uniquement l'insert d'intérêt avec les gènes *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7* (cf plus haut dans ce chapitre le schéma d'obtention de la lignée de maïs MON95379). La lignée génétiquement modifiée MON95379 ne porte pas l'insert contenant les gènes *cre* et *nptII* et n'exprime donc ni la recombinaise, ni la néomycine phosphotransférase II.

#### II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du maïs MON95379 (génération F4) ont été caractérisés par séquençage de nouvelle génération et analyse des séquences de jonction (NGS/JSA), séquençage direct sur des banques d'ADN génomique et séquençage dirigé (amplifications par PCR suivies de séquençage).

L'analyse des résultats obtenus par NGS/JSA montre une insertion unique de l'ADN-T dans le génome du maïs MON95379 et l'absence d'insertion de séquences issues du vecteur plasmidique PV-ZMIR522223 (hors ADN-T). L'excision de la cassette d'expression du gène *cp4 epsps* de l'insert, suite à l'action de la recombinaise dans le maïs hybride F1, est vérifiée.

Le séquençage ciblé des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (1000 pb de chaque côté) pour le maïs MON95379 (génération F4) et pour son témoin isogénique LH244, lignée parentale non transgénique, identifie une délétion de 160 pb dans le génome du maïs au niveau du site d'insertion. Le séquençage ciblé de l'insert et de ses régions flanquantes en 5' et en 3' dans le maïs MON95379 met en évidence une identité avec la séquence de l'ADN-T en dehors de délétions dans les bordures droite et gauche. Le pétitionnaire doit indiquer le nombre de bases éliminées au niveau du site d'insertion de l'ADN-T en comparaison avec le plasmide PV-ZMIR522223. L'absence de la cassette d'expression du gène *cp4 epsps*, de séquences issues du vecteur plasmidique (hors ADN-T) pour le plasmide PV-ZMIR522223 et de toute séquence du plasmide PV-ZM00513642 est confirmée.

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 ou allergéniques connues (2020). Ces analyses bioinformatiques montrent que l'insertion de l'ADN-T est localisée 46 pb en amont d'un gène prédit par annotation bioinformatique codant une protéine hypothétique. Le GT « Biotechnologie » souhaite que le pétitionnaire vérifie si ce gène est exprimé dans le maïs et dans ce cas, si son

niveau d'expression n'est pas modifié par la transformation génétique. La localisation chromosomique de l'insertion de l'ADN-T a eu lieu sur le chromosome 8.

Les gènes *Cry1B.868* et *Cry1Da\_7* codent les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7. Ces protéines sont classées par le pétitionnaire dans la famille des protéines Cry à 3 domaines. Ces deux protéines confèrent au maïs MON95379 une résistance à certains lépidoptères.

Le gène *Cry1B.868* est une séquence chimérique codant une protéine Cry. Elle est constituée des domaines I et II de Cry1Be de *Bacillus thuringiensis*, du domaine III de Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* et du domaine protoxine C-terminal de la protéine Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*.

Le gène *Cry1Da\_7* est une séquence mutée pour 4 acides aminés de la protéine Cry1Da de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Une alanine est ajoutée en position 2 du domaine I de la protéine pour optimiser l'expression dans la plante et trois acides aminés sont substitués dans le domaine II de la protéine pour augmenter son activité insecticide : la sérine en position 282 est remplacée par une valine, la tyrosine en position 316 par une sérine et l'isoleucine en position 368 par une proline.

Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 sont toutes deux synthétisées par le maïs sous forme de protoxines. Au niveau de l'intestin des insectes cibles, comme les autres protéines Cry à 3 domaines, elles seraient clivées par les enzymes digestives sous leurs formes de toxines actives. Elles se lieraient alors à des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, conduisant à la formation de pores et à la lyse cellulaire. Le pétitionnaire documente les propriétés insecticides des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 avec les travaux de Wang *et al.* (2019).

Les plantes de maïs MON95379 de génération F5F1 ont été cultivées sur 5 sites aux USA en 2018. Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 ont été quantifiées dans les grains et le fourrage à l'origine des produits consommés en alimentation animale et humaine. Leurs concentrations ont été mesurées à l'aide de test ELISA sur la génération F5F1 (fourrage) et F5F2 (grains).

Dans les grains de maïs MON95379, la concentration moyenne de protéine Cry1B.868 est de 26 ( $\pm$  3,5)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche et la concentration moyenne de protéine Cry1Da\_7 est de 0,25 ( $\pm$  0,0032)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche. Dans le fourrage de maïs MON95379, la concentration moyenne de protéine Cry1B.868 est de 110 ( $\pm$  8,2)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche et la concentration moyenne de protéine Cry1Da\_7 est de 26 ( $\pm$  2,1)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche.

L'analyse de ségrégation de l'ADN-T réalisée par PCR en temps réel sur 3 générations (F4F2, F4F3 et F4F4) permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. L'unicité et la stabilité génétique du locus GM du maïs MON95379 ont été démontrées au sein des générations F4, F5, F4F1, F5F1 et F6F1 par NGS/JSA en utilisant les témoins parentaux non transgéniques, LH244 et LH244 x HCL617.

#### II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs MON95379 permettent de caractériser ce maïs. Le GT « Biotechnologie » regrette l'absence des données d'expression du gène potentiel identifié par l'analyse bioinformatique. L'ensemble des éléments fournis pour la caractérisation moléculaire ne permet pas de mettre en évidence de risque lié à l'utilisation de ce maïs en alimentation humaine ou animale.

### II.1.3. Evaluation comparative

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

Le maïs MON95379 dans le fonds génétique LH244 x HCL617 est comparé à son témoin isogénique hybride non transgénique, la variété hybride LH244 x HCL617. Le pétitionnaire

utilise dix-sept variétés hybrides commerciales non génétiquement modifiées comme variétés de référence dans les essais réalisés en 2018.

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

Le maïs MON95379 dans le fonds génétique LH244 x HCL617, la variété témoin isogénique hybride LH244 x HCL617 et des variétés hybrides commerciales (4 variétés par site) ont été cultivés sur 8 sites en 2018. Ces sites expérimentaux sont indiqués par le pétitionnaire comme représentatifs de la production de maïs aux USA. Chaque modalité (variété témoin, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011, 2015).

Des échantillons de grains et de fourrage ont été récoltés sur les 8 sites d'essais.

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 MON95379, de la variété témoin 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 MON95379 est comparé à la variété témoin 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 de 5 % 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 63 composés sur les 78 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 le maïs MON95379 (grains et fourrage) est équivalent aux variétés commerciales de référence.

#### II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 10 paramètres dont 9 sont utilisables pour les analyses statistiques. Le maïs MON95379 apparaît équivalent aux variétés commerciales mises en œuvre sur le plan agronomique et phénotypique et n'est pas différent de son témoin 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.

#### II.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs MON95379 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 synthèse des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7, le maïs MON95379 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 MON95379 exprime les protéines exogènes Cry1B.868 et Cry1Da\_7 (cf chapitre II.1.2.2).

Les protéines exogènes Cry1B.868 et Cry1Da\_7 sont deux nouvelles protéines qui n'ont jamais été produites dans des plantes génétiquement modifiées. Elles sont classées par le pétitionnaire dans la famille des protéines Cry à 3 domaines. Ce sont des delta-endotoxines. La non-mise en évidence d'une toxicité des protéines Cry pour les mammifères pourrait s'expliquer par leur dégradation dans le milieu acide stomacal et l'absence de récepteurs. Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 sont toutes deux synthétisées par le maïs sous forme de protoxines. Au niveau de l'intestin des insectes cibles, elles seraient clivées par les enzymes digestives sous leurs formes de toxines actives. Elles se lieraient alors à des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, conduisant à la formation de pores et à la lyse cellulaire.

Le pétitionnaire cite des études de toxicité aiguë chez la souris réalisées avec chacune des deux protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 mais les rapports d'étude ne sont pas présentés. Des études de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur devraient être conduites selon la ligne directrice OCDE 407 (2008).

Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 ne présentent pas d'identité de séquences globale ou locale avec des protéines toxiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2020). Elles sont rapidement dégradées en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro* et sont dénaturées thermiquement à partir de 55 °C. Les teneurs en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 sont faibles dans les grains de maïs MON95379 (cf chapitre II.1.2.2).

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7. 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 Cry1B.868 et Cry1Da\_7.

#### 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 MON95379.

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

Une étude de toxicité sub-chronique pendant 90 jours chez le rongeur a été menée en 2019-2020 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.

Trois 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 MON95379,
- 33 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée MON95379 auquel s'ajoutent 17 % de maïs isogénique non génétiquement modifié LH244 x HCL617,
- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs isogénique non génétiquement modifié, LH244 x HCL617.

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 et les données historiques du centre investigateur 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.

Le GT « Biotechnologie » considère que le calcul de puissance proposé par le pétitionnaire n'est pas valide. En effet, ce calcul n'est effectué que pour huit paramètres et les tailles d'effets choisies par le pétitionnaire sans qu'il les justifie (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine) ne sont pas considérées comme appropriées. Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %.

#### II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Le GT « Biotechnologie » considère que les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 étant des nouvelles protéines, une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur est nécessaire pour documenter leur sécurité et devrait être fournie par le pétitionnaire. Ces études peuvent être réalisées de façon indépendante ou avec un mélange des deux protéines.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs MON95379 sur la base des éléments disponibles dans le dossier.

### 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 Cry1B.868 et Cry1Da\_7 exprimées dans le maïs MON95379 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,

- 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 Cry1B.868 et Cry1Da\_7 exprimées dans la plante génétiquement modifiée sont issues de différentes espèces de *Bacillus thuringiensis*. La bibliographie présentée n'évoque pas de risque particulier pour ces sources.

Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 ne présentent pas d'identité de séquences totale, globale ou locale avec des protéines allergéniques connues et répertoriées dans des bases de données actualisées ou avec les peptides immunotoxiques de la maladie cœliaque (2020). Elles sont rapidement dégradées en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro* et sont dénaturées thermiquement à partir de 55 °C. Les teneurs en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 sont faibles dans les grains de maïs MON95379 (cf chapitre II.1.2.2).

Les deux protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 exprimées dans le maïs MON95379 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 MON95379 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, le potentiel allergénique des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 exprimées dans le maïs MON95379 peut être considéré comme faible. Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les grains du maïs MON95379 et n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes.

Enfin, l'allergénicité du maïs MON95379 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

#### II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le maïs MON95379 et des variétés de maïs de référence.

### II.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 MON95379 pour l'animal et l'Homme.

Les concentrations moyennes en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2018 pour caractériser le maïs MON95379 (chapitre II.1.2.2). Dans les grains de maïs MON95379, elles sont de 26 µg/g de matière sèche et de 23 µg/g de matière fraîche pour la protéine Cry1B.868 et de 0,25 µg/g de matière sèche et de 0,22 µg/g de matière fraîche pour la protéine Cry1Da\_7. Dans le fourrage, elles sont de 110 µg/g de matière sèche pour la protéine Cry1B.868 et de 26 µg/g de matière sèche pour la protéine Cry1Da\_7.

L'estimation de la consommation journalière des protéines **par l'animal** est fondée sur les données de l'OCDE (2009), les teneurs moyenne et maximale en protéines Cry1B.868 et

Cry1Da\_7 des grains et du fourrage de maïs MON95379 et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré étant du maïs MON95379). Le pétitionnaire utilise des facteurs correctifs pour estimer les teneurs en protéines exogènes dans le « gluten feed » et dans les tourteaux à partir des teneurs dans les grains de maïs.

Les apports journaliers les plus élevés présentés par le pétitionnaire sont obtenus chez les vaches laitières. Ce scénario correspondrait à une ingestion moyenne de 4478 µg/kg de poids corporel (p.c.)/jour de protéine Cry1B.868 et de 619 µg/kg de poids corporel (p.c.)/jour de protéine Cry1Da\_7.

Le GT « Biotechnologie » considère que le pétitionnaire devrait utiliser les données de consommation les plus récentes présentes dans le document de l'OCDE (2013).

Le pétitionnaire a réalisé en 2020 une étude sur les expositions alimentaires aiguë et chronique **de l'Homme** aux protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 selon l'EFSA (2019b) qu'il a actualisée en 2021.

Les données de consommation aiguë et chronique des denrées sont issues des données de l'EFSA Comprehensive European Food Consumption Database<sup>4</sup> pour l'étude réalisée en 2020. Le pétitionnaire a ensuite utilisé en mars 2021, les données du fichier Excel sur le maïs mis à disposition sur le site de l'EFSA<sup>5</sup>.

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 négligeable en protéines de ces denrées. Elles ne constituent donc pas une source d'apport en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7. Le pétitionnaire a également exclu la consommation de pollen sans explication.

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 MON95379,
- les procédés de transformation des aliments n'impactent pas les concentrations en protéines exogènes Cry1B.868 et Cry1Da\_7 qui restent identiques à celles présentes dans les grains de maïs MON95379.

Les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 via la consommation de denrées issues de grains de maïs MON95379 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 EFSA. La concentration en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 utilisée pour ces calculs est la concentration moyenne mesurée dans les grains (matière première).

Sont repris dans le tableau 1 suite aux calculs réalisés par le pétitionnaire en 2021, les expositions alimentaires (moyenne et forts consommateurs) en protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 les plus élevées (µg/kg de poids corporel/jour) en indiquant aussi le pays, la catégorie de population et la catégorie de denrée la plus contributrice.

<sup>4</sup> <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

<sup>5</sup> <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>

**Tableau 1** : Expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 via la consommation de denrées issues de grains de maïs MON95379. Les valeurs sont exprimées en µg/kg de poids corporel/jour.

		Pays	Catégorie de population	Catégorie de denrée la plus contributrice	Cry1B.868	Cry1Da_7
Exposition aiguë	Moyenne	Danemark	Enfants en bas âge	Corn flakes	28,29	0,27
	Forts consommateurs	Roumanie	Other children	Maïs grain	349,52	3,34
Exposition chronique	Moyenne	Danemark	Enfants en bas âge	Corn flakes	28,3	0,27
	Forts consommateurs	Chypre	Nourrissons	Corn flakes	187,8	1,80

### II.3 Caractérisation des risques

Ce chapitre n'a pas été documentée pour l'animal.

Pour l'Homme, le pétitionnaire présente des calculs de marge de sécurité en se basant sur les données des études de toxicité aiguë chez la souris par administration orale unique des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 dont les rapports d'étude ne sont pas présents dans le dossier. De plus, le GT « Biotechnologie » considère que cette démarche n'est pas adaptée concernant l'exposition chronique, car elle ne permet pas d'estimer le risque associé à une exposition chronique aux produits issus du maïs MON95379. Il aurait été plus pertinent de calculer une marge de sécurité à partir de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL<sup>6</sup>) pouvant être déduite de l'étude de toxicité orale subchronique chez le rat par administration répétée pendant 90 jours.

### 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 deux bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du maïs MON95379. Elle a été complétée manuellement par ajout des références complémentaires identifiées dans des avis scientifiques provenant de 9 agences sanitaires<sup>7</sup>.

Les critères d'inclusion pour la sélection des articles sont décrits et jugés adéquats par le GT « Biotechnologie ».

<sup>6</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>7</sup> USDA, US FDA, US EPA, CFIA, Health Canada, FSANZ, CTNBio, CONABIA et MAFF

Le pétitionnaire a fait appel à 3 « reviewers » pour conduire cette analyse de façon indépendante dont deux externes au pétitionnaire. Le GT « Biotechnologie » regrette que l'organisme d'appartenance de ces « reviewers » ne soit pas renseigné, ce qui ne permet pas de juger de leur niveau d'indépendance par rapport au pétitionnaire. Il n'est pas fait mention d'un test de cohérence d'analyse entre les 3 « reviewers ».

Cette revue de la littérature a permis d'identifier 1269 références distinctes. Après sélection sur les critères d'inclusion, 9 publications ont été soumises à lecture et évaluation. La liste des 9 articles est fournie ainsi que la raison de leur exclusion. Trois ont été éliminées en raison de conclusions peu précises (incertitudes sur l'évènement utilisé), les 6 restantes ont été exclues car ne traitant pas du maïs MON95379, évènement récent. Le GT « Biotechnologie » considère que cette raison est trop restrictive. La recherche initiale aurait dû aussi prendre en compte les protéines Cry à l'origine de la protéine Cry1B.868 et d'autres plantes que le maïs.

### **Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »**

L'ensemble des éléments fournis pour la caractérisation moléculaire ne permet pas de mettre en évidence de risque lié à l'utilisation de ce maïs en alimentation humaine ou animale.

A l'exception de la synthèse des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7, le maïs MON95379 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence pour la composition des grains et du fourrage, ainsi que sur le plan agronomique et phénotypique.

Le potentiel allergénique des protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 paraît faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA. L'allergénicité du maïs MON95379 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

Les protéines Cry1B.868 et Cry1Da\_7 étant des nouvelles protéines, les éléments présentés dans le dossier sont insuffisants pour permettre au GT « Biotechnologie » de se prononcer sur leur sécurité en l'absence de fourniture d'une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur réalisée de façon indépendante ou avec un mélange des deux protéines.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs MON95379 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.

Dans ces conditions, le « GT Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du maïs MON95379.

## **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 MON95379 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 MON95379, résistance à des insectes, Cry1B.868, Cry1Da\_7  
GMO, MON95379 maize, *resistance to insects*, *Cry1B.868*, *Cry1Da\_7*

## BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- 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:lthaca, 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. 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. 2009. "Guidance Document on overview of Residue chemistry studies (as revised in 2009)." ENV/JM/MONO(2009)31, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France), 1-93.
- 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.

US EPA 2002 - Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency

Wang Y, Wang J, Fu X, Nageotte J R, Silverman J, Bretsnyder E C, Chen D, Rydel T J, Bean G J, Li K S, Kraft E, Gowda A, Nance A, Moore R G, Pleau M J, Milligan J S, Anderson H M, Asiimwe P, Evans A, Moar W J, Martinelli S, Head G P, Haas J A, Baum J A, Yang F, Kerns D L and Jerga A. 2019. "Bacillus thuringiensis Cry1Da\_7 and Cry1B.868 protein interactions with novel receptors allow control of resistant fall armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)". Applied and environmental microbiology 85, 16: e00579-19.

### 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 MON95379 développé pour être résistant à certains insectes (lépidoptères) pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2020-170). Maisons-Alfort : Anses, 15 p.