

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 17 juillet 2020

## **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 DP23211  
développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et résistant à certains insectes,  
pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et  
animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-163)**

---

*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 22 avril 2020 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 DP23211 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et résistant à certains insectes, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2019-163).

#### **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 effectuée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 28 mai et 2 juillet 2020 sur la base de rapports initiaux rédigés par six rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides 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 de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.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 2018 (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 le Canada, qui représentaient environ 81 % de la production mondiale. Cette production était de 1 147 621 938 tonnes pour une surface cultivée de 193 733 568 hectares (dont 69 207 039 tonnes pour une surface cultivée de 8 246 368 hectares dans l'Union européenne, FAOStat<sup>1</sup>) et en 2017, 30,7 % du maïs cultivé était génétiquement modifié (ISAAA<sup>2</sup>, 2018).

Les plantes sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien 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 DP23211 a été développé afin de lui conférer une résistance à certains coléoptères via l'expression d'une protéine insecticide et d'un ARN double brin (ARNdb) et une tolérance au glufosinate-ammonium.

Le maïs DP23211 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome la cassette d'expression d'un ARNdb destiné à inhiber l'expression du gène *DvSsj1<sup>4</sup>* de *Diabrotica virgifera virgifera* (ou chrysomèle des racines du maïs) par un mécanisme d'ARN interférence (ARNi) dans le but de conférer à la plante une résistance à cet insecte. Après ingestion par les larves de

<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

<sup>4</sup> *Diabrotica virgifera virgifera* smooth septate junction protein 1

certaines coléoptères, l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* est clivé en petits ARN interférents (« *small interfering RNA* », ARNsi). Ceux-ci se fixent sur les ARNm *DvSsj1* et bloquent leur traduction conduisant à une diminution de la teneur en protéine SSJ1. Cette diminution dans l'intestin de l'insecte perturberait la formation du complexe protéique SSJ (smooth septate junction membrane proteins) conduisant à une atteinte de la barrière intestinale, à une diminution de la croissance et à la mort des larves d'insectes (Hu *et al.*, 2019). La protéine SSJ1 serait une protéine orthologue de la protéine Snakeskin (SSK) de la drosophile, requise pour la fonction de barrière intestinale chez cet organisme.

Le maïs DP23211 a aussi été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *mo-pat*, *ipd072Aa*, *pmi* codant respectivement :

- une phosphinotricine N-acétyltransférase (protéine PAT). Elle confère à la plante la tolérance au glufosinate-ammonium en l'acétylant en N-acétyl L-glufosinate (NAG), métabolite non phytotoxique ;
- une protéine insecticide (protéine IPD072Aa). Suite à son ingestion, elle endommage l'épithélium intestinal des larves de certains coléoptères conduisant ainsi à leur mort ;
- une phosphomannose isomérase (protéine PMI). Elle catalyse l'isomérisation du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Cette enzyme est utilisée comme marqueur d'auxotrophie, permettant de sélectionner les cellules de maïs transformées pour leur capacité à utiliser le mannose comme seule source de carbone.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs DP23211. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce maïs venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

## PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

### II.1. Identification et caractérisation des dangers

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

La transformation génétique a été réalisée sur la variété de maïs (*Zea mays*) non transgénique PHR03.

#### II.1.2. Caractérisation moléculaire

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

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

La **première transformation génétique** se fait par bombardement de microprojectiles sur des tissus de maïs dans le but d'introduire trois plasmides : PHP56614, PHP21139 et PHP31729. En plus du plasmide PHP56614 contenant les séquences du site d'intégration spécifique, les deux plasmides supplémentaires PHP21139 et PHP31729 ont un rôle dans la régénération des plantes, sans intégration dans le génome du maïs. L'expression transitoire de trois gènes portés par les trois plasmides est recherchée afin de conduire à l'insertion du site d'intégration dans le génome du maïs et de régénérer des plantes transformées : *I-Crel*, *zm-wus2* et *zm-odp2*.

Le plasmide PHP56614 porte :

- des séquences du squelette plasmidique (origine de réplication et séquences nécessaires à la construction du plasmide) ;
- **les éléments utiles pour la recombinaison et non destinés à une insertion dans le génome du maïs :**
  - o deux sites *loxP*, sites de recombinaison du bactériophage P1 reconnu par la recombinaise Cre ;
  - o la séquence codante optimisée pour son expression dans le maïs, du gène de l'endonucléase I-Crel de *Chlamydomonas reinhardtii* sous le contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et d'autres éléments de régulation ;
- **la cassette du site d'intégration spécifique :**
  - o les séquences zm-SEQ8 et zm-SEQ9 qui encadrent la cassette, séquences de maïs permettant la recombinaison homologue médiée par I-Crel et conduisant à l'insertion du site d'intégration spécifique ;
  - o le promoteur du gène de l'ubiquitine 1 de maïs et ses séquences régulatrices ;
  - o le site FRT1, cible de recombinaison pour la flippase de *Saccharomyces cerevisiae* ;
  - o le gène de la néomycine phosphotransférase II (gène *nptII*) du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* ;
  - o le terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de *Solanum tuberosum* ;
  - o un site FRT87, cible de recombinaison modifié pour la flippase de *Saccharomyces cerevisiae*.

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 PHP31729 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*.

Suite à l'entrée des trois plasmides dans les cellules de maïs, l'endonucléase I-Crel crée une cassure double brin de l'ADN au niveau des séquences cibles zm-SEQ8 et zm-SEQ9 localisées sur le chromosome 1 du maïs et par recombinaison homologue avec ces deux séquences cibles également présentes dans le plasmide PHP56614, introduit la cassette du site d'intégration spécifique dans le génome de maïs. L'expression transitoire des protéines WUS2 et ODP2 facilite la régénération de plantules au cours des étapes suivant la transformation. Les plantes transformées contenant le site d'intégration spécifique ont été sélectionnées. Elles ont été caractérisées par SbS.

La **seconde étape de la transformation génétique** est effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des lignées transformées de maïs contenant le site d'intégration spécifique. Le but de cette transformation est d'insérer une partie de l'ADN-T du plasmide PHP74643 dans ce site d'intégration spécifique au niveau des sites de recombinaison pour la flippase. En plus d'un squelette plasmidique, le vecteur PHP74643 porte un unique ADN-T et des gènes de virulence d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales. Son ADN-T contient huit cassettes d'expression dont seulement quatre sont destinées à s'intégrer dans le génome du maïs, celles qui sont encadrées par les deux sites de recombinaison pour la flippase. Le tableau 1 résume les différents éléments présents dans l'ADN-T du plasmide PHP74643.

**Tableau 1 :** Description des huit cassettes d'expression entre la bordure droite et la bordure gauche de l'ADN-T du plasmide PHP74643.

Différents éléments présents entre les cassettes ne sont pas indiqués dans ce tableau.

	Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 <sup>ère</sup> colonne)
<b>Cassettes d'expression non destinées à s'intégrer dans la lignée DP23211</b>			
	<i>zm-wus2</i>  gène <i>Wuschel 2</i>	<i>Zea mays</i>	Promoteur du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> et terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>
	<i>zm-odp2</i>  gène de la « ovule development protein2 »	<i>Zea mays</i>	Promoteur, séquence 5' non traduite et séquence intronique du gène de l'ubiquitine 1 de <i>Zea mays</i> et terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>
	<i>mo-Flp exons 1 et 2</i>  Exons 1 et 2 du gène de la flippase (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Promoteur, séquence 5' non traduite et séquence intronique du gène de l'ubiquitine 1 de <i>Zea mays</i> , exon 1 du gène de la flippase, région intronique du gène <i>Ls1</i> de <i>Solanum tuberosum</i> , exon 2 du gène de la flippase et terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>
	<i>DsRed2</i>  gène de la protéine fluorescente rouge (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Discosoma sp.</i>	Région enhancer 35 S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur, promoteur d'un gène de protéine de transfert de lipides spécifique de l'aleurone d' <i>Hordeum vulgare</i> et séquence terminatrice 35 S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur
<b>FRT1</b> <b>Site cible de recombinaison pour la flippase</b>			
<b>Cassettes d'expression destinées à être intégrées dans la lignée DP23211</b>			
	<i>pmi</i>  gène d'une phosphomannose isomérase	<i>Escherichia coli K-12</i>	Terminateur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de <i>Solanum tuberosum</i>

	Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 <sup>ère</sup> colonne)
	<i>mo-pat</i>  gène d'une phosphinotricine N-acétyltransférase (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Promoteur et région intronique du gène de l'actine d' <i>Oryza sativa</i> et séquence terminatrice 35 S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur
	ARN double brin (ARNdb) destiné à inhiber l'expression du gène <i>DvSsj1</i>	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Promoteur, séquence 5' non traduite et séquence intronique de du gène de l'ubiquitine 1 de <i>Zea mays</i> , séquence contenant les codons stop dans les 6 cadres de lecture, partie de séquence du gène <i>DvSsj1</i> , codons stop, connecteur issu de l'intron 1 du gène de l'alcool déshydrogénase de <i>Zea mays</i> , codons stop, partie de séquence du gène <i>DvSsj1</i> , séquence contenant les codons stop dans les 6 cadres de lecture et terminateur d'un gène de gamma-zéine de <i>Zea mays</i>
	<i>lpd072Aa</i>  Gène de la protéine insecticide IPD072Aa (séquence optimisée pour l'expression dans le maïs)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Promoteur du banana streak virus de la souche acuminata Yunnan, séquence intronique du gène de la calmoduline 5 prédite de <i>Zea mays</i> et terminateur d'un gène putatif d'une protéine de liaison au mannose d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>FRT87 (site cible de recombinaison modifié pour la flippase)</b>			

Le but recherché de la transformation génétique était d'obtenir une intégration des quatre cassettes d'expression souhaitées par recombinaison homologue au niveau des sites cibles de recombinaison FRT.

L'expression transitoire de la flippase est nécessaire pour pouvoir réaliser cette recombinaison homologue et l'expression des protéines WUS2 et ODP2 favorise la régénération des plantules cultivées *in vitro*.

La cassette d'expression du gène *pmi* ne possède pas de séquence promotrice, une insertion aux sites de recombinaison FRT lui permet d'être suffisamment proche du promoteur présent dans la séquence du site d'intégration spécifique nouvellement créé pour pouvoir permettre 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 cette construction sont sélectionnées.



Dans le cas où l'ADN-T s'intégrerait au-delà des quatre cassettes souhaitées ou en copie supplémentaire dans le génome du maïs, la synthèse de la protéine RED2 spécifiquement dans l'aleurone (promoteur spécifique) conduirait à une coloration rouge fluorescente des grains des plantes régénérées. L'expression de cette protéine peut donc aussi aider pour écarter des lignées transformées ne correspondant pas à la transformation DP23211 recherchée.

Enfin, la présence des séquences insérées souhaitées et l'absence de séquences des différents squelettes plasmidiques ont été démontrées dans des plantes T<sub>1</sub> par SbS.

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

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du maïs DP23211 (génération T1) ont été caractérisés par NGS selon la technologie SbS. L'analyse des résultats obtenus montre une insertion unique des séquences génétiques attendues dans le chromosome 1 du maïs, sans séquence en dehors de celles souhaitées provenant des plasmides PHP56614 et PHP74643. Il n'y a pas d'intégration des séquences plasmidiques PHP21139 et PHP31729 dans le génome des plantes T1.

Le séquençage ciblé (méthode Sanger) des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (environ 1500 pb en 5' et 2200 pb en 3') ainsi que de l'insert complet pour le maïs DP23211 (hybride F1) et des régions flanquantes pour son témoin (PHEJW/PHR03), met en évidence une identité de séquences avec les séquences attendues provenant du plasmide PHP56614 au niveau des sites d'insertion (séquences de recombinaison) et aucune délétion dans le génome du maïs. L'absence de séquences en dehors de celles attendues suite aux deux transformations est confirmée par le séquençage complet de l'insert.

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

Ces analyses bioinformatiques confirment la localisation de l'insertion des cassettes d'intérêt sur le chromosome 1.

La caractérisation des 3 protéines nouvellement exprimées (PAT, PMI et IPD072Aa) purifiées à partir du maïs DP23211 a été réalisée :

- par SDS-page pour confirmation de leur poids moléculaire ;
- par Western blot pour confirmer également leur poids moléculaire et vérifier leur immunoréactivité ;
- par détermination de la masse des peptides issus de la digestion simulée *in vitro* et identification ;
- par coloration des glycoprotéines pour vérifier l'absence de modifications post-traductionnelles ;
- par séquençage N terminal pour vérifier leurs identités et l'absence de clivage. En dehors du clivage post-traductionnel de la méthionine en N terminal, les protéines PAT et IPD072Aa produites dans le maïs DP23211 sont identiques à la protéine PAT de *Streptomyces viridochromogenes* et à la protéine IPD072Aa de *Pseudomonas chlororaphis*. La protéine PMI produite dans le maïs DP23211 est identique à la protéine PMI d'*Escherichia coli* K-12.

Les maïs DP23211 et le témoin quasi-isogénique PHEJW/PHR03 ont été cultivés sur 6 sites (5 aux USA et 1 au Canada) en 2018 avec ou sans traitement au glufosinate-ammonium pour le maïs GM. Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD072Aa ont été quantifiées par ELISA et les teneurs en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* par QuantiGenPlex assay, dans les différentes parties de la plante et à différents stades de développement de l'hybride F1 (PHEJW/PHR03). Les

concentrations des trois protéines sont suffisantes pour quantification dans tous les tissus analysés. Les teneurs moyennes les plus élevées dans le maïs DP23211 respectivement traité ou non traité au glufosinate-ammonium sont rencontrées dans les racines pour la protéine IPD072Aa (de 18 à 27 et de 21 à 31 µg/g de matière sèche selon le stade de développement), dans le pollen pour la protéine PAT (54 et 58 µg/g de matière sèche) et la protéine PMI (33 et 33 µg/g de matière sèche), et dans les feuilles pour l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* ( $2,93 \times 10^{-2}$  à  $7,08 \times 10^{-2}$  et  $1,32 \times 10^{-2}$  à  $6,46 \times 10^{-2}$  µg/g de matière sèche selon le stade de développement).

Le tableau 2 présente les teneurs en protéines nouvellement exprimées et en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1*, mesurées dans les grains et le fourrage qui sont à l'origine des produits consommés en alimentation humaine et animale.

**Tableau 2 :** Teneurs en protéines exogènes et en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* et pourcentages d'efficacité d'extraction (% EE) pour chaque substance, dans le fourrage et les grains de maïs DP23211 traité ou non avec le glufosinate-ammonium (exprimées en µg/g de matière sèche).

	Protéine exogène ou ARNdb	PAT		PMI		IPD072Aa		ARNdb dirigé contre le gène <i>DvSsj1</i>	
		% EE	Teneur	% EE	Teneur	% EE	Teneur	% EE	Teneur
Grains	Maïs non traité Moyenne (gamme)	96	5,1 (2,5-8,1)	85	4,3 (2,3-6,3)	82	2,1 (0,51-4,8)	85	$4,13 \times 10^{-3}$ ( $1,22 \times 10^{-3}$ - $1,09 \times 10^{-2}$ )
	Maïs traité Moyenne (gamme)	96	4,3 (2,0-6,6)	85	3,9 (1,6-6)	82	1,8 (0,21-5,7)	85	$3,14 \times 10^{-3}$ ( $7,36 \times 10^{-4}$ - $1,05 \times 10^{-2}$ )
Fourrage	Maïs non traité Moyenne (gamme)	80	8,2 (4,8-11)	71	9,4 (6,2-17)	72	16 (6,0-28)	92	$1,90 \times 10^{-2}$ ( $9,77 \times 10^{-3}$ - $5,65 \times 10^{-2}$ )
	Maïs traité Moyenne (gamme)	80	7,9 (5,2-12)	71	9,3 (4,8-13)	72	16 (6,4-38)	92	$2,38 \times 10^{-2}$ ( $1,23 \times 10^{-2}$ - $7,43 \times 10^{-2}$ )

Les niveaux d'expression des protéines PAT, PMI et IPD072Aa et de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* dans les grains et dans le fourrage ne sont pas modifiés par le traitement avec du glufosinate-ammonium.

Une approche prédictive de la sécurité de l'interférence par ARNdb du gène *DvSsj1* au sein du maïs DP23211 ainsi que de la production potentielle de petits ARN interférents (ARNsi) issus de son clivage par les RNases Dicer est présentée dans le dossier. Les analyses *in silico* (marche nucléotide par nucléotide) réalisées sur des séquences de 21 pb révèlent une absence d'homologie de séquence de 100 % entre les ARNsi et le transcriptome de maïs. Dix-sept identités partielles (de 1 à 4 mis-appariements) sont identifiées entre les ARNsi et le transcriptome de maïs. Le pétitionnaire présente les identités et les fonctions biologiques potentielles des cibles. Il en conclut que la production de l'ARNdb par le maïs DP23211 ne conduirait pas à un potentiel effet de « silencing » sur les gènes de maïs potentiellement ciblés.

Le « GT Biotechnologie » considère que les informations fournies ne renseignent pas sur les dérégulations potentielles de l'expression des cibles identifiées par le pétitionnaire. Des données complémentaires sont nécessaires pour renseigner ces éventuelles dérégulations (par exemple, la réalisation de RT-PCR quantitatives sur les 17 cibles potentielles sur des échantillons de grains et de fourrage).



La stabilité génétique du locus GM du maïs DP23211 a été confirmée par Southern blot sur cinq générations (T1, T2, T3, T4 et T5).

L'analyse de ségrégation de l'insert réalisée par PCR quantitative sur 5 générations (T1, T5, BC<sub>1</sub> F1 dans un fonds génétique, BC<sub>1</sub> F1 et BC<sub>1</sub> F2 dans un autre fonds génétique) permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. La co-ségrégation entre le génotype et le phénotype (tolérance au glufosinate-ammonium) est également montrée.

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

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs DP23211 soulèvent des questions concernant les potentiels effets hors cibles (« off-target » effects) de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1*. Le GT « Biotechnologie » considère que les informations fournies ne renseignent pas sur les dérégulations potentielles de l'expression des cibles identifiées par le pétitionnaire. Des données complémentaires sont nécessaires pour renseigner ces éventuelles dérégulations.

### II.1.3. Evaluation comparative

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

Le maïs DP23211 est comparé à l'hybride F1 témoin quasi-isogénique (PHEJW/PHR03). Quatorze lignées de maïs commerciales non transgéniques ont été utilisées comme variétés de référence parmi les différents essais.

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

Le maïs DP23211, l'hybride témoin quasi-isogénique et les variétés de référence (quatre variétés par site) ont été cultivés en 2018 sur douze sites (onze aux USA et un au Canada). Ces sites sont indiqués comme représentatifs des zones de production du maïs. Chaque modalité (variété quasi-isogénique, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Pour la variété génétiquement modifiée, deux modalités sont réalisées : soit les plantes subissent les mêmes traitements que les variétés témoins, soit elles sont traitées au glufosinate-ammonium. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011).

Des échantillons 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 (1 site au Canada et 7 sites aux USA). Le pétitionnaire indique que le choix de ces 8 sites s'est basé sur une distribution géographique permettant de représenter la diversité des conditions pédoclimatiques et qu'il a eu lieu avant la réalisation des analyses.

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

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium, de la variété témoin quasi-isogénique ou des variétés commerciales de référence),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Le maïs DP23211 (traité ou non avec du glufosinate-ammonium) est comparé à la variété témoin quasi-isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et 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) sauf pour le sélénium, la vitamine C et le DIMBOA qui n'ont pas été recherchés. Le pétitionnaire a ajouté des mesures analytiques pour le manganèse, la vitamine B5 (acide pantothénique), l'inositol et 11 acides gras supplémentaires et il a calculé la teneur en tocophérols totaux. Le GT « Biotechnologie » estime que l'analyse de composition présentée est adéquate.

#### II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 71 composés sur les 81 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 fourrage de maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium est équivalent à celui des variétés commerciales de référence. Le fourrage de maïs DP23211 traité au glufosinate-ammonium est légèrement différent de la variété témoin quasi-isogénique pour sa teneur en carbohydrates (83,6 % de la matière sèche au lieu de 83 % pour le maïs quasi-isogénique). Cette différence ne se retrouve pas dans la comparaison avec le maïs DP23211 traité avec les « herbicides témoins ». Le fourrage de maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium est différent de celui du maïs témoin quasi-isogénique pour sa teneur en calcium (0,230 % de la matière sèche avec le maïs DP23211 traité au glufosinate-ammonium, 0,239 % avec le maïs DP23211 traité avec les « herbicides témoins » au lieu de 0,266 % avec le maïs témoin quasi-isogénique). Ces deux différences sont faibles. Le GT « Biotechnologie » considère que ces deux différences de composition du fourrage de maïs n'ont pas de signification biologique.

Pour les grains de maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium, l'analyse combinée de l'ensemble des 8 sites d'expérimentation révèle quelques différences entre le maïs DP23211 et le maïs témoin quasi-isogénique ainsi que des non équivalences avec les variétés de référence (tableau 3).

**Tableau 3** : Composés des grains présentant une non-équivalence avec les variétés de référence (classés en catégories III et IV) ou une différence avec la variété témoin quasi-isogénique

Comparaison	Tests d'équivalence		Tests de différence	
	Maïs DP23211 traité avec les « herbicides témoins »/Variétés de référence	Maïs DP23211 traité avec du glufosinate-ammonium/Variétés de référence	Maïs DP23211 traité avec les « herbicides témoins »/Maïs témoin quasi-isogénique	Maïs DP23211 traité avec du glufosinate-ammonium /Maïs témoin quasi-isogénique
<b>Composés</b>				
Analyse globale	Type 5 pour les protéines brutes	Type 5 pour les protéines brutes	Différence pour les cendres	
Acides aminés	Type 5 pour l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la cystéine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, la sérine, la thréonine et la valine Type 7 pour l'histidine et la proline	Type 5 pour l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'isoleucine et la leucine Type 6 pour l'histidine et la phénylalanine Type 7 pour la proline	Différence pour la méthionine	Différence pour l'arginine, la glycine, l'histidine, la lysine, la phénylalanine et la tyrosine
Acides gras			Différence pour l'acide palmitoléique, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide arachidique, l'acide éicosénoïque et l'acide béhénique	Différence pour l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique et l'acide éicosénoïque
Minéraux	Type 5 pour le manganèse Type 7 pour le magnésium et le phosphore	Type 6 pour le phosphore Type 7 pour le magnésium		Différence pour le cuivre, le magnésium et le phosphore
Vitamines			Différence pour la vitamine B6 et alpha-tocophérol	Différence pour le bêta-carotène, les vitamines B1, B6 et B9
Métabolites secondaires et substances anti-nutritionnelles	Type 5 pour l'acide phytique		Différence pour l'acide p-coumarique	Différence pour l'acide férulique et l'acide phytique

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

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

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

Des différences de composition avec les grains de maïs témoin quasi-isogénique sont observées pour 12 substances dans les grains de maïs DP23211 traité avec les « herbicides témoins » et pour 19 substances dans les grains de maïs DP23211 traité avec du glufosinate-ammonium.

En comparaison avec les variétés de référence de l'étude, les grains de maïs DP23211 traité avec les herbicides témoins comportent des teneurs pour 13 substances classées en « non équivalence probable » (catégorie III type 5) et pour 4 substances classées en « non équivalence » (catégorie IV type 7). Pour les grains de maïs DP23211 traité avec du glufosinate-ammonium, les teneurs pour 9 substances se classent en « non équivalence probable » (catégorie III) dont

6 substances en type 5 et 3 en type 6 et pour 2 substances classées en « non équivalence » (catégorie IV type 7).

A partir d'une base de données interne (multi-sites et multi-années) de composition de variétés de maïs non génétiquement modifiées, une analyse statistique a été réalisée par le pétitionnaire afin de générer des intervalles de tolérance pour les différents composés du maïs à partir de données historiques sur 144 variétés de maïs de référence, non génétiquement modifiées. Les données analytiques présentes dans cette base de données interne ont été obtenues à partir d'échantillons provenant de 28 essais multi-sites réalisés entre 2003 et 2017 sur 148 sites représentatifs des zones de production du maïs aux USA (106 sites), en Argentine (23 sites), au Chili (7 sites), au Canada (6 sites) et au Brésil (6 sites). Ces intervalles de tolérance sont utilisés par le pétitionnaire pour appréhender la variation naturelle des paramètres biologiques des variétés de maïs commerciales.

Le pétitionnaire présente une analyse complémentaire pour déterminer si les variations de composition des grains de maïs entre la variété DP23211 et les variétés de référence ont une signification biologique potentielle. Pour chaque substance présentant une non équivalence (catégorie IV) et une non équivalence probable (catégorie III) avec les variétés de référence de cette étude, le pétitionnaire regroupe les différentes conclusions des comparaisons de composition réalisées dans cette étude et confronte les teneurs en substances avec les intervalles de tolérance générés à partir de sa base de données interne.

Ainsi, pour les composés présentant des non équivalences et des non équivalences probables avec les variétés de référence mises en œuvre dans les 8 sites d'expérimentation :

- la composition des grains de maïs DP23211 non traité avec du glufosinate-ammonium (traité avec des « herbicides témoins ») n'est pas différente de la variété témoin quasi-isogénique et les teneurs de ces composés entrent dans les intervalles de tolérance construits à partir de l'étude sur la base de données interne du pétitionnaire sauf pour quelques dosages de la cystéine et de l'acide phytique. Le GT « Biotechnologie » en conclut que la composition du maïs DP23211 pour ces substances est non différente du témoin quasi-isogénique et semble caractéristique du fonds génétique de cette variété. Ces non équivalences ne seraient donc pas liées à la transformation génétique.
- les grains de maïs DP23211 traité avec du glufosinate-ammonium présentent une composition différente du témoin quasi-isogénique pour les teneurs en histidine, phénylalanine, magnésium, phosphore et acide phytique. Ces variations sont faibles.

#### II.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.

A l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP23211 traité ou non apparaît équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique.

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

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs DP23211 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

#### II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, à l'exception de la tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP23211 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence sur le plan agronomique et phénotypique et pour la composition du fourrage.

Pour le grain, le maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium n'est pas différent du témoin quasi isogénique. Il montre quelques non équivalences de composition avec les variétés de référence. L'équivalence de composition des grains de maïs DP23211 avec les variétés de

référence n'est que partiellement démontrée par cette étude. L'évaluation nutritionnelle chez le poulet présente dans le dossier est donc nécessaire pour renseigner la sécurité du maïs DP23211.

#### II.1.4. Toxicologie

##### II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Trois protéines exogènes PAT, PMI et IPD072Aa sont exprimées dans le maïs DP23211.

La protéine IPD072Aa est une nouvelle protéine. Elle n'a jamais été utilisée dans la transformation de plantes génétiquement modifiées. Les propriétés insecticides de la protéine IPD072Aa sont liées aux dommages qu'elle engendre suite à son ingestion, sur l'épithélium intestinal des larves de certains coléoptères conduisant ainsi à leur mort.

La protéine IPD072Aa utilisée pour les différentes études a été produite dans une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli*. Son équivalence structurale et fonctionnelle avec la protéine IPD072Aa synthétisée dans le maïs DP23211 a été démontrée.

La stabilité thermique de la protéine IPD072Aa a été déterminée en recherchant son activité biologique contre des coléoptères lorsqu'elle est ajoutée à leur alimentation. Pour cela, la protéine est soumise à différents traitements thermiques avant incorporation dans l'aliment. L'inactivation de la protéine IPD072Aa est montrée suite à un autoclavage (121°C, 30 min).

Le pétitionnaire présente une étude de toxicité aiguë chez la souris CD1 à la dose unique de 2000 mg/kg pc et une étude de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours.

En 2019, une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris CD1 (10 souris par sexe) a été menée par gavage à 3 doses de 100, 300 et 1000 mg/kg p.c./ jour de la protéine IPD072Aa. Elle a été réalisée selon la ligne directrice OCDE 407 (2008) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données de cette étude ne mettent pas en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine IPD072Aa.

L'identité des protéines PAT et PMI présentes dans le maïs DP23211 avec les protéines présentes dans d'autres plantes génétiquement modifiées ayant fait l'objet d'autorisations de mise sur le marché est vérifiée. En conséquence, le pétitionnaire renvoie aux évaluations antérieures réalisées par l'EFSA sur ces plantes, aux données bibliographiques et à un historique de consommation sûre. La présentation d'une synthèse des principaux résultats toxicologiques de ces deux protéines serait souhaitable. Aucune étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les protéines PAT et PMI n'est disponible.

Les trois protéines exogènes PAT, PMI et IPD072Aa 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*.

Les protéines PAT et PMI sont inactivées respectivement au-delà de 60 °C et de 65 °C et la protéine IPD072Aa par autoclavage (121 °C, 30 min). Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD072Aa sont faibles dans les grains et le fourrage issus du maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium (cf chapitre II.1.2.1).

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines PAT, PMI et IPD072Aa. Ce point devrait être argumenté.

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

Les gènes introduits dans le génome du maïs DP23211 n'ont pas pour objectif de modifier sa composition en dehors de la synthèse des protéines PAT, PMI et IPD072Aa et de l'expression d'un ARN double brin (ARNdb) destiné à inhiber l'expression du gène *DvSsj1* chez certains coléoptères.



Via un mécanisme d'ARN interférence (ARNi), la synthèse d'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* chez le maïs DP23211 diminuerait l'expression de la protéine SSJ1 chez les larves de certains coléoptères l'ayant consommé, les conduisant à la mort. Le maïs DP23211 porterait ainsi une résistance ciblée contre certains coléoptères.

Les teneurs en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* mesurées dans les échantillons de maïs DP23211 traité ou non au glufosinate-ammonium sont respectivement de  $2,38 \times 10^{-2}$  µg/g de matière sèche et  $1,90 \times 10^{-2}$  µg/g de matière sèche dans le fourrage et de  $3,14 \times 10^{-3}$  µg/g de matière sèche et  $4,13 \times 10^{-3}$  µg/g de matière sèche dans les grains (cf chapitre II.1.2.1).

Une évaluation des potentiels effets hors cibles (off-target effects) des petits ARN interférents (ARNsi) est réalisée par analyse bioinformatique sur les transcriptomes humains et animaux (porc, bovin, poulet, dinde, saumon, mouton, chèvre, chat et chien) qui sont les potentiels consommateurs de maïs. Aucune séquence, issue des différents transcriptomes testés, ne présente une homologie de 100 % avec un ARNsi potentiel de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* (recherche effectuée sur des séquences d'ARNsi définies avec fenêtres glissantes de 21 pb sur les brins sens et antisens de l'ARNdb). Le GT « Biotechnologie » considère que des paramètres moins contraignants devraient aussi être appliqués afin d'identifier des identités partielles entre les ARNsi et les transcriptomes humain et animaux, comme cela a été fait pour les comparaisons avec le transcriptome de maïs. Dans le cas d'identification de cibles potentielles, des informations supplémentaires devraient alors être apportées pour documenter les effets hors cibles potentiels.

Concernant l'étude d'effets sur des espèces animales non cibles liés à des ARNdb utilisés dans des démarches d'ARN interférence, le pétitionnaire s'appuie aussi sur plusieurs publications et sur la revue de Dávalos *et al.* (2019). Ces éléments de littérature apparaissent pertinents et ne mettent pas en évidence un risque lié à la présence des ARNdb.

#### 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 issus du maïs DP23211.

#### 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 rat a été menée en 2019 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (2018) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données brutes sous format électronique et le programme de calcul sont fournis.

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

- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée DP23211,
- 33 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée DP23211 auquel s'ajoute 17 % de maïs isogénique non génétiquement modifié PHEJW/PHR03,
- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs isogénique non génétiquement modifié, PHEJW/PHR03,
- 50 % (p/p) de grains moulus de 3 variétés commerciales non génétiquement modifiées, P0928, P0993 et P1105.

Le maïs DP23211 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 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 pétitionnaire s'appuie sur l'article de Hong *et al.* (2017) pour justifier le nombre d'animaux par groupe. Le GT « Biotechnologie » considère que cet article n'est pas adapté puisque présentant des tailles d'effets cible qui ne sont pas considérées comme appropriées (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine). Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %. Le pétitionnaire utilise dans son analyse des données, une correction pour tests multiples pour contrôler le FDR (false discovery rate) qui n'est pas prise en compte dans le calcul de puissance et qui conduit à une diminution de la puissance réelle de l'étude (van der Voet, 2018). De plus, en cas « d'outliers », le pétitionnaire refait l'analyse en les enlevant et sans appliquer la correction pour tests multiples pour contrôler le FDR. Cette différence de méthode n'est pas justifiée.

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

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

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines PAT, PMI et IPD072Aa ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale. La recherche d'homologie de séquences entre les ARNsi et les transcriptomes humain et animaux devrait être complétée en utilisant des paramètres moins contraignants afin d'identifier des identités partielles. Dans ce cas, des argumentations complémentaires devraient être apportées sur ces cibles potentielles.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs DP23211 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier, en raison du calcul de puissance considéré comme non valide.

### 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 PAT, PMI et IPD072Aa exprimées dans le maïs DP23211 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2017).

Les sources des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée sont *Streptomyces viridochromogenes* pour PAT, *Escherichia coli* souche K-12 pour PMI et *Pseudomonas chlororaphis* pour IPD072Aa. La bibliographie présentée n'évoque pas de risque particulier pour ces sources.

Les protéines PAT, PMI et IPD072Aa offrent une résistance faible à la dégradation par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées *in vitro*.

Les teneurs en protéines PAT, PMI et IPD072Aa sont faibles dans les grains et le fourrage issus du maïs DP23211 traité ou non avec du glufosinate-ammonium.

Les protéines PAT et PMI sont inactivées respectivement au-delà de 60 °C et de 65 °C. L'inactivation de la protéine IPD072Aa est montrée seulement après autoclavage (121 °C, 30 min).

L'analyse bioinformatique des ORF potentiels au niveau des jonctions et de l'insert dans le maïs DP23211 permet au pétitionnaire d'identifier 4 ORFs dont les protéines putatives correspondantes présentent un pourcentage d'identité > 35 % avec des allergènes de la base COMPARE 2019. Ces identités ne dépassent pas 38 %, ont des E-scores souvent très élevés, sont régulièrement dispersées le long des séquences et n'intéressent qu'un nombre très limité d'acides aminés

successifs. Ces identités de séquences paraissent fortuites et dépourvues de signification biologique.

La recherche d'identités de séquences entre les protéines PAT, PMI et IPD072Aa et des protéines toxiques et allergéniques avérées a été effectuée avec l'algorithme FASTA et une fenêtre glissante de 80 résidus. Les protéines PAT, PMI et IPD072Aa exprimées dans le maïs génétiquement modifié DP23211 ne présentent pas d'identités globales avec les allergènes de la banque AllergenOnline (version 2020).

Par contre, la recherche des identités locales (100 % d'identité sur une fenêtre glissante de 8 résidus) effectuée par le GT "Biotechnologie" montre une identité locale (séquence DLSDKETT) de la protéine PMI avec la parvalbumine Ran e 1 de grenouille (*Rana* sp.). La présence de deux sites 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  $\alpha$  de grenouille ne porte que sur une région très limitée de la protéine.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'identité de séquence entre les protéines PAT, PMI et IPD072Aa et des toxines avérées ou des protéines adjuvantes confirmées. Par ailleurs, les faibles teneurs de ces protéines dans le maïs DP23211 et leur sensibilité aux protéases digestives sont *a priori* incompatibles avec un effet adjuvant significatif dans le cadre d'un apport alimentaire modéré en maïs génétiquement modifié DP23211.

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

Les trois protéines exprimées dans le maïs DP23211, PAT, PMI et IPD072Aa, 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

Le pétitionnaire rappelle, à juste titre, que le maïs n'est pas considéré comme un aliment allergénique majeur. Il ne figure pas dans la liste des allergènes dont l'étiquetage est obligatoire. Par ailleurs, aucune des informations disponibles au sujet du maïs DP23211 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 éléments fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des protéines PAT, PMI et IPD072Aa exprimées dans le maïs DP23211 peut être considéré comme faible. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, l'allergénicité du maïs DP23211 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

#### II.1.6. Évaluation nutritionnelle

En 2019, le pétitionnaire a réalisé une évaluation nutritionnelle des grains de maïs DP23211, de la variété témoin quasi-isogénique PHEJW/PHR03 et de trois variétés de référence non

génétiquement modifiées (P0928, P0993 et P1105) dans l'alimentation de poulets à croissance rapide. Le maïs DP23211 utilisé dans cette étude a été traité avec du glufosinate-ammonium. Les trois variétés de référence sont les mêmes que celles mises en œuvre dans l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat (chapitre II.1.4.4).

Le maïs était incorporé à des taux de 63,5 % dans les aliments de démarrage (0-21 jours), de 67 % dans les aliments de croissance (22-35 jours) et de 64 % dans les aliments de finition (36-42 jours). Des poulets de souche Ross 708 ont été élevés pendant 42 jours en parquet de 10 animaux, avec 6 parquets par sexe et par groupe expérimental.

L'analyse de composition des différents régimes n'a pas mis en évidence de différence entre les lots. Les teneurs en protéines PAT, IPD072Aa, PMI et en ARNdb contre *DvSsj1* ont été mesurées dans les différentes rations « démarrage », « croissance » et finition » produites avec des grains de maïs DP23211.

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

Les paramètres de performance de croissance, de mortalité et de rendement en carcasse mesurés sur les poulets nourris avec les grains de maïs DP23211 ne sont pas différents significativement de ceux qui sont mesurés sur les poulets nourris avec les grains de la variété témoin quasi-isogénique ou des variétés de référence.

Les grains issus des maïs DP23211, témoin quasi-isogénique et des variétés de référence non génétiquement modifiées possèdent donc des valeurs nutritionnelles équivalentes.

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

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au maïs DP23211 pour l'animal et l'Homme.

L'estimation de la consommation journalière des protéines PAT, PMI et IPD072Aa et de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* **par l'animal** est fondée sur les données de l'OCDE (2013) relatives à la consommation de maïs par les animaux d'élevage, les teneurs moyennes en protéines et ARNdb du fourrage et des grains de maïs DP23211 et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré étant du maïs DP23211).

Les concentrations moyennes en protéines et ARNdb utilisées pour ces calculs proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2018 pour caractériser le maïs DP23211 (chapitre II.1.2.2). Elles sont générées à partir des analyses du fourrage et des grains de maïs DP23211 traité au glufosinate-ammonium et converties en µg/g de matière sèche avec correction pour tenir compte de l'efficacité d'extraction. Elles sont de 9,9 µg/g de matière sèche pour PAT, de 13 µg/g de matière sèche pour PMI et de 22 µg/g de matière sèche pour IPD072Aa et de 0,0259 µg/g de matière sèche pour l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* pour le fourrage et de 4,6 µg/g de matière sèche pour PAT, de 4,6 µg/g de matière sèche pour PMI et de 2,2 µg/g de matière sèche pour IPD072Aa et de 0,00369 µg/g de matière sèche pour l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* pour les grains.

Dans ces conditions, les apports journaliers les plus élevés sont obtenus chez les poulets de chair pour la consommation de grains et chez les poules pondeuses pour la consommation de fourrage ou fourrage + grains. Ces scénarios correspondraient à une ingestion de 0,23 mg/kg de poids corporel/jour pour PAT, de 0,23 mg/kg de poids corporel/jour pour PMI et de 0,11 mg/kg de poids corporel/jour pour IPD072Aa et de 0,00018 mg/kg de poids corporel/jour pour l'ARNdb dirigé

contre le gène *DvSsj1* pour les poulets de chair, et à une ingestion de 7 mg/kg de poids corporel/jour pour PAT, de 9,1 mg/kg de poids corporel/jour pour PMI et de 15 mg/kg de poids corporel/jour pour IPD072Aa et de 0,018 mg/kg de poids corporel/jour pour l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* pour les poules pondeuses.

L'estimation de l'exposition alimentaire aiguë et chronique **de l'Homme** aux protéines PAT, PMI et IPD072Aa et à l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* via la consommation de grains de maïs DP23211 est réalisée selon les recommandations de l'EFSA (2015, 2019a).

Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées et en ARNdb utilisées pour ces calculs proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2018 pour caractériser le maïs DP23211 (chapitre II.1.2.2). Elles sont générées à partir des analyses des grains de maïs DP23211 traité au glufosinate-ammonium et converties en µg/g de matière fraîche (calculs effectués en tenant compte de l'efficacité d'extraction et du facteur de conversion masse sèche/matière fraîche). Elles sont de 3,6 µg/g de matière fraîche pour PAT, de 3,6 µg/g de matière fraîche pour PMI et de 1,7 µg/g de matière fraîche pour IPD072Aa et de 0,00287 µg/g de matière fraîche pour l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1*.

Les données de consommation aiguë et chronique des denrées sont issues des données de l'EFSA Comprehensive European Food Consumption Database<sup>5</sup>. Les denrées contenant du maïs et les facteurs de conversion proviennent des statistiques de consommation de maïs disponible sur le site de l'EFSA (EFSA, 2019b). 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 :

- tout le maïs consommé est du maïs DP23211,
- les procédés de transformation des aliments n'impactent pas les concentrations en protéines exogènes et en ARNdb qui restent identiques à celles présentes dans les grains de maïs DP23211.

Les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines PAT, PMI et IPD072Aa et à l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* via la consommation de grains de maïs DP23211 sont alors calculées selon les mêmes équations et pour toutes les catégories de population et chaque étude alimentaire présente dans la base EFSA. En sélectionnant les données de consommation aiguë ou chronique et la « substance d'exposition » (protéines PAT, PMI ou IPD072Aa ou ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1*), les moyennes des expositions alimentaires aiguë et chronique correspondent pour chaque denrée, à la somme des consommations moyennes multipliées par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion.

Pour les forts consommateurs, les expositions alimentaires aiguë et chronique correspondent à la consommation au percentile 95 de la denrée la plus contributrice multipliée par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion, à laquelle s'ajoute pour toutes les autres denrées, la somme des consommations moyennes multipliées par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion. Les différentes denrées étant obtenues à partir d'un mélange de grains, la concentration de la substance utilisée dans ce calcul est la concentration moyenne mesurée dans les grains (matière première) et non un percentile élevé de la concentration.

Sont repris dans le tableau 4, les expositions alimentaires calculées (moyenne et forts consommateurs) en protéines PAT, PMI et IPD072Aa et en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* les plus élevées (µg/kg de poids corporel/jour) en indiquant aussi le pays et la catégorie de population.

<sup>5</sup> <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>



**Tableau 4** : Expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines PAT, PMI et IPD072Aa et à l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* via la consommation de grains de maïs DP23211. Les valeurs sont exprimées en µg/kg de poids corporel/jour.

		Pays	Catégorie de population	PAT	PMI	IPD072Aa	ARNdb dirigé contre le gène <i>DvSsj1</i>
<b>Exposition aiguë</b>	<b>moyenne</b>	Danemark	Enfants en bas âge (Toddlers)	4,47	4,47	2,11	0,004
	<b>Forts consommateurs</b>	Roumanie	Enfants (Other children)	54,72	54,72	25,84	0,044
<b>Exposition chronique</b>	<b>moyenne</b>	Danemark	Enfants en bas âge (Toddlers)	4,47	4,47	2,11	0,004
	<b>Forts consommateurs</b>	Finlande	Nourrissons (Infants)	20,32	20,32	9,60	0,016

### II.3 Caractérisation des risques

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

L'exposition en protéines PAT, PMI et IPD072Aa et en ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1* des poulets impliqués dans l'étude nutritionnelle (paragraphe II.1.6) pourrait être calculée et comparée aux estimations de la consommation journalière de ces protéines chez les poulets (paragraphe II.2). En l'absence d'études d'alimentarité spécifiques, le GT « Biotechnologie » considère que le risque ne peut pas être caractérisé pour les autres animaux de rente.

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

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

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

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

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2009-2019, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (2019c) pour procéder à cette revue systématique de la littérature.

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

Les quatre bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du maïs DP23211. Une base de données a été créée à partir de ces recherches. Elle a été complétée manuellement par ajout des références complémentaires identifiées dans des avis scientifiques provenant de 4 agences sanitaires<sup>6</sup> ainsi que dans trois articles récents portant sur le maïs DP23211 et sur les nouvelles protéines. Les listes des titres des publications identifiées par les recherches dans les 4 bases de données ainsi que les listes des titres des références ajoutées manuellement sont fournies. Les

<sup>6</sup> USDA, CFIA, FSANZ, Japan MAFF

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

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

Cette revue de la littérature a permis d'identifier 738 références distinctes dont la liste des titres est présente dans le dossier. Après sélection sur les critères d'inclusion, 22 références ont été soumises à lecture et évaluation. Après analyse, les « reviewers » ont exclu 16 publications (titres et raisons d'exclusion fournies) et ont jugé pertinentes 6 publications. Ces 6 publications sont mises à disposition dans le dossier. Une publication portant sur une revue de littérature de la sécurité environnementale de la protéine PAT par le CERA<sup>7</sup> a été écartée. Les auteurs de 4 publications sur les 5 restantes sont affiliés au pétitionnaire.

Le pétitionnaire conclut que le faible nombre de publications obtenues après l'étape de « scoping review » ne lui permet pas de réaliser une revue systématique. Selon le pétitionnaire, cette « scoping review » n'a pas mis en évidence de risque sanitaire pour la consommation humaine ou animale du maïs DP23211.

---

<sup>7</sup> Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation

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

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs DP23211 soulèvent des questions concernant les potentiels effets hors cibles (« off-target » effects) de l'ARNdb dirigé contre le gène *DvSsj1*. Le GT « Biotechnologie » considère que les informations fournies ne renseignent pas sur les dérégulations potentielles de l'expression des cibles identifiées par le pétitionnaire. Des données complémentaires sont nécessaires pour renseigner ces éventuelles dérégulations.

De plus, la recherche d'homologie de séquences entre les ARNsi et les transcriptomes humain et animaux devrait être complétée en utilisant des paramètres moins contraignants afin d'identifier des identités partielles. Dans ce cas, des argumentations complémentaires devraient être apportées sur ces cibles potentielles.

A l'exception de sa tolérance au glufosinate-ammonium, le maïs DP23211 apparaît équivalent aux variétés commerciales de référence sur le plan agronomique et phénotypique et pour la composition du fourrage. L'équivalence de composition des grains de maïs DP23211 avec les variétés de référence n'est que partiellement démontrée. L'évaluation nutritionnelle chez le poulet montre que les grains issus des maïs DP23211, témoin quasi-isogénique et des variétés de référence non génétiquement modifiées possèdent des valeurs nutritionnelles équivalentes.

Le potentiel allergénique des protéines nouvellement exprimées dans le maïs DP23211 peut être considéré comme faible. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. L'allergénicité du maïs DP23211 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines PAT, PMI et IPD072Aa ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du maïs DP23211 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.

## **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 DP23211 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-CLES

OGM, maïs DP23211, tolérance au glufosinate-ammonium, résistance à des insectes, PAT, PMI, IPD072Aa, DvSsJ1, ARNi

*GMO, maize DP23211, tolerance to glufosinate-ammonium, resistance to insects, PAT, PMI, IPD072Aa, DvSsJ1, iRNA*

## BIBLIOGRAPHIE

Dávalos A, Henriques R, Latasa MJ, Laparra M and Coca M. 2019. "Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed". EFSA Supporting Publications 16, 1688E.

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 2010; 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. 2015. "Use of EFSA comprehensive European food consumption database for estimating dietary exposure to genetically modified foods". EFSA Journal 13:4034, 11 pp.

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

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

EFSA. 2019b. "Summary statistics of consumption data - maize. EFSA comprehensive European food consumption database." <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>. Accessed August 6, 2019

EFSA. 2019c. "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:EN-1614, 1-62.

Hong B, Du Y, Mukerji P, Roper JM, Appenzeller LM. 2017. « Safety Assessment of Food and Feed from GM Crops in Europe: Evaluating EFSA's Alternative Framework for the Rat 90-day Feeding Study ». Journal of agricultural and food chemistry 65, 5545-5560.

Hu X, Steimel JP, Kapka-Kitzman DM, Davis-Vogel C, Richtman NM, Mathis JP, Nelson ME, Lu AL, Wu GS. 2019. « Molecular characterization of the insecticidal activity of double-stranded RNA targeting the smooth septate junction of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) ». PLoS One 14. 10.1371/journal.pone.0210491

ISAAA. 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. *ISAAA Brief* No. 54. ISAAA: Ithaca, NY.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE. 2002. "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites." Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 6. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

OCDE. 2013. "Guidance Document on Residues in Livestock." Series on Pesticides, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

OCDE. 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, Editions OCDE, Paris.

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

van der Voet H. 2018. "Safety assessments and multiplicity adjustment: Comments on a recent paper". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (9), 2194-2195