

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 9 août 2023

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du
Règlement (CE) n° 1829/2003, du maïs génétiquement modifié MON95275,
développé pour être résistant à certains coléoptères,
pour l'importation, la transformation ainsi que
l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM
(dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-173)**

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 2 septembre 2022 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 MON95275, développé pour être résistant à certains coléoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-173).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments - European Food Safety Authority (EFSA) - est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA permet cependant aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. Dans ce cadre, la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses pour participer à cette consultation par l'EFSA dans un délai de 90 jours et pour émettre un avis sur ce dossier initial, vis-à-vis des exigences de la réglementation applicable sur ce dossier.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 13 octobre et 17 novembre 2022 et le 13 juillet 2023 sur la base de rapports initiaux rédigés par dix rapporteurs experts du GT « Biotechnologie » et deux rapporteurs externes. Elle a été conduite en se basant sur les documents guide de l'EFSA et de son Panel GMO ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ». Les commentaires à transmettre à l'EFSA ont été validés par le GT en séance du 17 novembre 2022 et transmis à la DGCCRF le 30 novembre 2022 (annexe) afin de permettre aux autorités françaises de participer à la consultation des États membres organisée par l'EFSA.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA sont utilisées ci-dessous.

A. Informations générales

Le maïs est une culture des zones tempérées à tropicales. En 2021 (FAOSTAT¹), les dix premiers pays producteurs étaient les États-Unis, la Chine, le Brésil, l'Argentine, l'Ukraine, l'Inde, le Mexique, l'Indonésie, l'Afrique du Sud et la France, qui représentaient environ 80 % de la production mondiale. Cette production était estimée à 1 210 235 135 tonnes pour une surface cultivée de 205 870 016 hectares (dont 72 987 920 tonnes pour une surface cultivée de 9 247 050 hectares dans l'Union européenne). En 2019, la culture de maïs génétiquement modifié représentait 31 % de la surface cultivée mondiale de maïs (ISAAA², 2019).

Les plantes de maïs sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien à maturité pour une utilisation des grains mûrs en alimentation animale ou humaine. Le maïs est également utilisé pour la production de biocarburants, de biogaz ou de bioplastique. Il est pauvre en protéines et la teneur des grains en deux acides aminés essentiels, la lysine et le tryptophane, est faible. Le grain contient également des substances anti-nutritionnelles (acide phytique, DIMBOA³, inhibiteurs de trypsine et de chymotrypsine, raffinose).

¹ <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>

² Données de l'ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications), <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>

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

Le maïs MON95275 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant :

- les gènes *mpp75Aa1.1* et *vpb4Da2* codant respectivement les protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 qui confèrent au maïs MON95275 une résistance à certains coléoptères (*Diabrotica* spp.),
- la séquence d'un ARN double brin (ARNdb *DvSnf7.1*) qui est destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7* de *Diabrotica virgifera virgifera* par un mécanisme d'ARN interférence (ARNi), dans le but de conférer au maïs MON95275 une résistance à cet insecte.

Le dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-173 est une première demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du maïs génétiquement modifié MON95275 pour son importation, sa transformation, et son utilisation en alimentation humaine et animale dans l'Union européenne, sans demande de mise en culture.

Pour rappel, toutes les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et les aliments destinés à l'alimentation animale dans l'Union européenne (UE) sont, entre autres, soumis à une limite maximale pour les résidus (LMR) de produits phytopharmaceutiques afin de protéger la santé animale et humaine (Règlement (CE) n° 396/2005).

B. Informations scientifiques

3.1.1. B.1. Identification et caractérisation des dangers

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

La modification génétique a été réalisée sur la lignée élite non transgénique de maïs (*Zea mays*) LH244.

Le pétitionnaire mentionne que le flux de gènes par l'intermédiaire du pollen, c'est-à-dire la pollinisation croisée, est le plus important dans les premiers mètres puis décroît rapidement avec la distance ; la distance d'isolement utilisée habituellement pour tenir compte de ce flux de gènes est de 200 mètres.

Cependant, le GT « Biotechnologie » remarque que les études mettant en évidence l'existence de flux de gènes par le pollen à longue distance sont manquantes dans le dossier, en particulier selon la direction des vents dominants et lorsque la surface du champ de maïs d'origine est importante (Lu *et al.*, 2019). La distance maximale rapportée dans la littérature pour le flux de gènes entre parcelles de maïs est de 4,45 km (Hofmann *et al.*, 2014).

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de tenir compte de la littérature scientifique disponible concernant les conditions d'occurrence de flux de gènes à longue distance du maïs.

La téosinte (*Zea mays* ssp *mexicana*) est une espèce végétale considérée comme adventice, sexuellement compatible avec le maïs, présente en Europe (Espagne, France). Le pétitionnaire mentionne sa présence en Europe, en citant la problématique de gestion qu'elle génère en tant que plantes adventices. Cependant, il ne décrit, ni ne prend en compte suffisamment cette situation, alors que la possibilité de croisement et d'introgession de gènes du maïs dans les populations de téosintes considérées comme plantes adventices est documentée (EFSA, 2016 et 2022).

Le GT « Biotechnologie » considère que la littérature retenue dans ce dossier est incomplète ; les études concernant les populations de téosintes considérées comme adventices en Europe ne sont notamment pas citées. L'introgession de gènes de maïs dans la téosinte est considérée comme improbable par le pétitionnaire, alors qu'elle a été démontrée pour les populations de téosintes observées en France, celles-ci ayant introgressé spontanément un gène de résistance à un herbicide présent dans des variétés de maïs cultivées en France (Le Corre *et al.*, 2020).

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de prendre en compte la présence de populations de téosintes considérées comme adventices dans l'Union européenne et la possibilité d'introggression de gènes de maïs dans la téosinte, documentées dans la littérature scientifique.

B.1.2. Caractérisation moléculaire

B.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

L'événement de transformation MON95275 a été obtenu par transformation génétique d'embryons immatures de la lignée de maïs LH244 par la souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* ABI portant le vecteur binaire PV-ZMIR525664 contenant un ADN-T. Après cette co-culture, les embryons transformés ont été sélectionnés 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) transférées sur sol. Les plantes R1 issues d'autopollinisation des R0 ont été sélectionnées sur la présence de l'ADN-T et l'absence de régions du vecteur non destinées au transfert, dans leur génome. Leur descendance R2 a été soumise à une caractérisation moléculaire et phénotypique approfondie.

Les plantes R2 sélectionnées ont été croisées avec une seconde lignée de maïs génétiquement modifiée (GM) exprimant la recombinaise Cre. Cette 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 recombinaise Cre.

Les plantes F1 issues de ce croisement sont des maïs hybrides hétérozygotes portant les deux ADN-T provenant chacun d'un des parents. L'expression de la recombinaise Cre dans les plantes F1 génère une double cassure de l'ADN au niveau des sites cibles *loxP* conduisant à l'excision de la cassette d'expression du gène *cp4epsps*. Les hybrides F1 sont autofécondés et les plantes F2 ne portant pas les gènes *cre* et *cp4epsps* sont conservées. Des autofécondations successives sont ensuite réalisées. Les plantes F4 sélectionnées sont les plantes homozygotes pour l'insert (séquences de l'ADN-T portant l'ARNdb *DvSnf7.1* et les gènes d'intérêt *mpp75Aa1.1* et *vpb4Da2*, après excision de la cassette d'expression du gène *cp4epsps*) et ne portant ni d'autres séquences du plasmide PV-ZMIR525664 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 MON95275.

Le plasmide PV-ZMIR525664 utilisé pour la transformation initiale porte les cassettes d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* et des gènes *mpp75Aa1.1*, *vpb4Da2* et celle du gène *cp4epsps* (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 la recombinaise Cre et la cassette d'expression du gène *neo* (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-ZMIR525664 :

Les quatre cassettes d'expression sont composées des séquences fonctionnelles suivantes (intercalées de séquences non codantes destinées à minimiser les effets potentiels sur l'expression des gènes des cassettes voisines) :

1) Cassette d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* :

- Séquence amplificatrice optimisée du gène *pIIg* du maïs,
- Promoteur et séquence « leader » du transcrite 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur CaMV,
- Séquence intronique et flanquant un exon du gène *hsp70* du maïs codant la protéine *heat shock 70* (HSP70),

- Deux fois la même séquence partielle (240 pb) du gène *Snf7* de l'insecte *Diabrotica virgifera virgifera* codant la sous-unité Snf7 du complexe ESCRT-III, agencées de façon inversée, intercalées avec une séquence d'ADN de clonage de 150 pb, destinées à produire un ARNdb de 240 pb,
 - Séquence de terminaison 3' UTR du gène *E9* de la famille de gènes *rbcS* du pois.
- 2) Casette d'expression du **gène *mpp75Aa1.1*** :
- Séquence amplificatrice de la région promotrice d'un virus de la mosaïque du dahlia (DaMV),
 - Promoteur et séquence « leader » d'un gène *RCc3* de l'herbe grama (*Tripsacum dactyloides*),
 - Intron d'un gène putatif *14-3-3c* du millet des oiseaux (*Setaria italica*),
 - Séquence codante optimisée du gène *mpp75Aa1.1* codant la protéine Mpp75Aa1.1 de la bactérie *Brevibacillus laterosporus* (les codons de la séquence nucléotidique ont été optimisés pour l'expression chez le maïs),
 - Séquence de terminaison 3' UTR d'un gène *Hsp* de l'herbe à chapelets (*Coix lacryma-jobi*).
- 3) Casette d'expression du **gène *vpb4Da2*** :
- Séquence amplificatrice de la région promotrice d'un virus de la mosaïque du dahlia (DaMV),
 - Promoteur et séquence « leader » d'un gène de maïs codant une protéine de transfert de lipides (LTP),
 - Intron d'un gène d'actine du millet des oiseaux (*Setaria italica*),
 - Séquence codante optimisée du gène *vpb4Da2* codant la protéine Vpb4Da2 de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (les codons de la séquence nucléotidique ont été optimisés pour l'expression dans le maïs),
 - Séquence de terminaison 3' UTR d'un gène S-adénosylméthionine synthétase 1 du millet des oiseaux (*Setaria italica*).
- 4) Casette d'expression du **gène *CP4 epsps*** :
- Site de recombinaison *loxP* du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinase Cre,
 - Promoteur et séquence « leader » 5'UTR et séquences introniques de la famille de gènes des alpha-tubulines *OsTubA* du riz (*Oryza sativa*),
 - Séquence d'adressage du gène *ShkG* de l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) codant la région du peptide de transit de l'EPSPS, qui conduit au transport de la protéine vers le chloroplaste,
 - Séquence codante du gène *aroA* de la bactérie *Agrobacterium sp.* souche CP4 codant la protéine CP4 EPSPS,
 - Séquence de terminaison 3'UTR du gène de l'alpha-tubuline *OsTubA* du riz (*Oryza sativa*),
 - Site de recombinaison *loxP* du bactériophage P1 reconnaissable par la recombinase Cre.

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

Les cassettes d'expression des gènes *Cre* et *neo* 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 phosphotransférerase 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 de la plante GM.

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

- Séquences promotrice, « leader », intronique et la région 5' non codante du gène de l'actine 1 du riz (*Oryza sativa*),

- Séquence codante partielle du premier exon du gène de la recombinaise Cre du bactériophage P1,
- Séquence du second intron d'un gène inductible par la lumière (LS1) de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*),
- Séquence codante partielle du second exon du gène de la recombinaise Cre du bactériophage P1,
- Séquence de la région 3' non codante du gène de la protéine « heat shock », HSP17, du blé tendre (*Triticum aestivum*).

La séquence codante du **gène neo** du transposon Tn5 de la bactérie *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 synthétase de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* pTi.

L'insert situé 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 cassettes d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* et des gènes d'intérêt *mpp75Aa1.1* et *vpb4Da2* (cf plus haut dans ce chapitre, le schéma d'obtention de la lignée de maïs MON95275). La lignée génétiquement modifiée MON95275 ne porte pas l'insert contenant les gènes *cre* et *neo* et n'exprime donc ni la recombinaise, ni la néomycine phosphotransférase II.

Les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 appartiennent à la super famille des « beta-Pore-Forming Proteins » (β -PFP). Cette famille de protéines est caractérisée par un mécanisme d'action par oligomérisation et formation de pores (constitués de feuilletts beta) au niveau de la membrane de l'épithélium intestinal des insectes cibles, après activation protéasique et fixation à des récepteurs membranaires spécifiques.

Mpp75Aa1 fait partie des toxines bactériennes produites au cours de la sporulation de *Brevibacillus laterosporus*, tandis que Vpb4Da2 fait partie des toxines secrétées durant la phase végétative de *Bacillus thuringiensis*.

Mpp75Aa1 ainsi que Mpp75Aa1.1 qui a été optimisée à partir de Mpp75Aa1 sont des protéines à trois domaines et font partie plus précisément de la sous-famille ETX_MTX2 (*Epsilon toxin_Mosquitocidal toxin2*) des *aerolysin-like* β -PFP, au même titre que des protéines connues pour leur toxicité, comme ETX (Epsilon toxin) de la bactérie *Clostridium perfringens* (Alves *et al.*, 2014). Mpp75Aa1.1 est le premier membre de cette famille à avoir été caractérisé pour son activité insecticide contre *Diabrotica virgifera virgifera* (Kouadio *et al.*, 2021a).

Vpb4Da2, du groupe Vpb avec une structure à six domaines, apparenté aux protéines de liaison aux toxines binaires Vip, est de structure similaire à la classe d'exotoxines B des β -PFP (Kouadio *et al.*, 2021b).

Le GT « Biotechnologie » constate que le pétitionnaire revendique un historique d'utilisation sûre sur la base de l'expression de protéines Cry et Vip dans d'autres plantes génétiquement modifiées (PGM), protéines qui ne sont pas des mêmes familles structurales que Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2.

Le GT « Biotechnologie » considère que le pétitionnaire ne peut pas avancer d'historique d'utilisation sûre pour les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2. Le GT demande que le pétitionnaire réalise une évaluation spécifique de la sécurité sanitaire des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2.

L'ARNdb *DvSnf7.1* a été conçu pour cibler l'expression du gène *DvSnf7* de *D. virgifera virgifera* codant la protéine SNF7, une sous unité du complexe ESCRT-III (*Endosomal Sorting complex Required for Transport*). Ce complexe est impliqué dans des processus biologiques fondamentaux, en particulier le tri des récepteurs membranaires adressés aux lysosomes.

L'inactivation du gène *DvSnf7* dans les larves de *D. virgifera virgifera* est visée suite à l'ingestion de maïs MON95275. L'ARNdb *DvSnf7.1* exprimé par le maïs MON95275 est reconnu par les RNAses Dicer et clivé en petits ARN interférents de 21 nucléotides (ARNsi). Dans les cellules de *D. virgifera virgifera*, ces ARNsi sont incorporés dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui reconnaît l'ARNm complémentaire issu de la transcription du gène *DvSnf7* et le clive, conduisant ainsi à une diminution de la teneur en protéine SNF7 puis à la mort des cellules intestinales.

La cassette d'expression d'un ARNdb destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7* est aussi présente dans le maïs MON87411⁴, ARNdb *DvSnf7*. Le maïs MON87411 a fait l'objet d'une autorisation dans l'Union européenne (décision d'autorisation de la Commission européenne du 26 juillet 2019). Le maïs MON95275 a été conçu pour exprimer la même séquence d'ARNdb que le maïs MON87411 avec toutefois la recherche d'une meilleure efficacité insecticide. Le pétitionnaire indique que les cassettes d'expression de ces deux ARNdb sont identiques pour la séquence inversée répétée de l'ARN *DvSnf7* mais diffère au niveau de leur séquence promotrice en utilisant le promoteur constitutif du gène du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur CaMV dans le maïs MON95275. Une séquence « enhancer » pIIIG-Zm1 a été ajoutée avant ce promoteur ainsi qu'une séquence de 55 pb à la suite de ce promoteur, 46 pb de plus que pour le maïs MON87411. Selon le pétitionnaire, le but de ces modifications est d'augmenter l'expression de l'ARNdb afin d'améliorer l'efficacité insecticide dans le maïs MON95275.

Le pétitionnaire cite des données d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* provenant d'analyses par northern blot complétées par des données d'analyse de séquence censées confirmer que les transcrits obtenus sont bien ceux attendus, identiques à ceux exprimés chez le maïs MON87411, sans fournir ces études. Il se base sur celles-ci pour affirmer que les évaluations de la sécurité sanitaire réalisées pour l'ARNdb *DvSnf7* exprimé dans le maïs MON87411 sont applicables à l'ARNdb *DvSnf7.1* exprimé dans le maïs MON95275.

Le GT « Biotechnologie » demande la fourniture des données expérimentales d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275, afin de vérifier l'identité des ARNdb *DvSnf7.1* et *DvSnf7* et de connaître le niveau d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dont l'augmentation est indiquée par le pétitionnaire.

B.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

La caractérisation moléculaire du maïs MON95275 par des techniques de séquençage à haut débit a mis en évidence un site d'insertion unique d'une copie de l'ADN-T d'intérêt.

Le pétitionnaire détermine une insertion unique des séquences génétiques attendues et n'identifie pas de séquence en dehors de celles souhaitées.

Des techniques plus spécifiques (amplification spécifique du locus d'insertion par PCR suivie de séquençage et d'analyses moléculaires) ont permis de caractériser la région d'insertion de l'ADN-T dans le maïs MON95275, démontrant que la séquence effectivement insérée est identique à celle de l'ADN-T présent dans le vecteur PV-ZMIR525664, à l'exception (1) d'un nucléotide différent dans une séquence intermédiaire non codante de l'insert, et (2) de la délétion de la cassette d'expression du gène *cp4 epsps*, avec le maintien d'un site *loxP*, comme attendu.

L'organisation génomique au site d'insertion a été évaluée en comparant les séquences flanquantes de l'insert dans le maïs MON95275 à la séquence génomique du maïs témoin quasi-isogénique LH244. Cette analyse a mis en évidence chez le maïs MON95275, une délétion de 746 pb dans le génome du maïs au niveau du site d'insertion et une co-insertion de 6 pb en région flanquante 3' de l'insert. Les analyses bioinformatiques FASTA des

⁴ Le maïs MON87411 a fait l'objet de deux avis de l'Anses du 10 novembre 2015 (saisine 2015-SA-0195) et du 23 janvier 2019 (saisine 2018-SA-0141).

séquences flanquantes de l'insert ont montré que l'insertion de l'ADN-T n'avait pas interrompu de gènes endogènes et qu'elle avait eu lieu sur le chromosome 3 du génome du maïs.

L'analyse bioinformatique des ORFs (cadres ouverts de lecture) potentiels créés aux sites de jonctions de l'insert avec l'ADN génomique ou au sein de l'insert a porté sur les six cadres possibles de lecture. Des analyses *in silico* ont été effectuées dans des bases de données actualisées en 2021 à la recherche d'homologie avec des allergènes (AD_2021), des toxines (TOX_2021) et des protéines avec une activité biologique potentiellement néfaste (PRT_2021).

Dans la séquence de l'insert, les seules homologies détectées correspondent aux séquences des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2. Les protéines identifiées avec des homologies sont des toxines appartenant à la super famille de protéines formant des pores beta (*beta-pore forming proteins*) à laquelle appartiennent les deux protéines nouvellement exprimées dans le maïs MON95275. Les séquences des domaines de liaison à des récepteurs de ces protéines ne s'alignent avec aucun autre domaine des protéines répertoriées dans la base de données de toxines. Le pétitionnaire conclut de ces résultats que les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ne montrent pas d'homologie de séquences avec des toxines connues envers des mammifères et autres vertébrés. Aucune homologie significative n'a été identifiée avec des allergènes ou avec des protéines à activité biologique potentiellement néfaste dans la séquence de l'insert.

De même aux jonctions avec l'insert et dans l'ADN génomique flanquant l'insert, les six cadres de lecture ont été analysés par le pétitionnaire sans identifier des identités totale, globale ou locale avec des protéines présentes dans les bases de données de protéines toxiques ou allergéniques.

L'expression des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 a été analysée par la technique ELISA dans des plantes entières et sur différents types d'échantillons de tissus végétaux (incluant fourrage, grains, pollen, feuilles, racines, soies, tiges) des plantes de maïs MON95275 récoltées à différents stades de développement, cultivées en 2019 sur six sites aux États-Unis. Les teneurs des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 les plus élevées se trouvent dans les soies, avec des moyennes respectives de 120 µg/g et 56 µg/g de matière sèche pour Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2. Les teneurs des deux protéines les plus faibles se situent sous les niveaux de quantification dans le pollen, établis respectivement à 0,125 µg/g de matière sèche pour Mpp75Aa1.1 et à 0,157 µg/g de matière sèche pour Vpb4Da2.

Pour les deux produits destinés à l'alimentation humaine et animale (fourrage et grains), la moyenne de la teneur en protéine Mpp75Aa1.1 est de 16 µg/g de matière sèche dans le fourrage (gamme de 12 à 25) et de 1,3 µg/g de matière sèche dans les grains (gamme de 0,67 à 1,9). La moyenne de la teneur en protéine Vpb4Da2 est de 3,3 µg/g de matière sèche dans le fourrage (gamme de 2,5 à 4,8) et de 1,2 µg/g de matière sèche dans les grains (gamme de 0,42 à 1,9).

Concernant l'ARNdb *DvSnf7.1*, le pétitionnaire indique que pour diverses raisons, il considère les niveaux d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* comme non pertinents pour l'évaluation des risques du maïs MON95275. Il renvoie aux données de l'expression de l'ARNdb *DvSnf7* présenté pour le maïs MON87411.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de compléter le dossier avec des données propres à renseigner les niveaux d'expression de *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275 puisqu'il les annonce plus élevés que dans le maïs MON87411.

Les données d'expression dans le maïs MON87411 n'étant donc pas transposables, le GT « Biotechnologie » considère qu'il est nécessaire de rechercher l'ARNdb et les petits ARN interférents (ARNsi) issus de son clivage dans les différents tissus du maïs MON95275.

L'évaluation des potentiels effets hors cible (*off-target effects*) des petits ARN interférents (small interfering RNA, ARNsi) générés à partir de l'ARNdb *DvSnf7.1* s'appuie dans le dossier sur la recherche d'une identité partielle de séquences entre l'ARNsi et un ARNm cellulaire. Le

pétitionnaire compare la séquence nucléotidique de l'ARNdb *DvSnf7.1* (fenêtre glissante de 21 nucléotides) à une base de données du transcriptome de maïs (NCBI, 2021). L'analyse *in silico* réalisée révèle une absence d'identité de séquence entre les ARNsi et ce transcriptome.

Le GT « Biotechnologie » considère que les informations sur la production de l'ARNdb par le maïs MON95275 ne sont pas suffisantes pour écarter un effet potentiel d'extinction d'expression de gène(s) (*silencing*) chez le maïs et chez les consommateurs de ce maïs. Le GT demande que des analyses bioinformatiques complémentaires soient réalisées et fournies avec les transcriptomes des consommateurs destinataires du maïs MON95275 (animaux de rente et Homme) et que, dans cette analyse, des paramètres moins contraignants soient appliqués (hypothèse d'un « mésappariement ») y compris avec le transcriptome de maïs. Dans le cas où des gènes « cibles potentielles » seraient identifiés, il serait nécessaire de rechercher le niveau d'expression de ces gènes dans le maïs MON95275 et dans son comparateur quasi-isogénique non génétiquement modifié.

La stabilité génétique de l'insert du maïs MON95275 a été confirmée par NGS (Next generation sequencing) sur cinq générations (F4, F5, F6, F4F1 et F5F1). L'analyse de ségrégation du maïs MON95275 a été effectuée sur trois générations (F4F2, F4F3, F4F4) par des résultats de PCR en temps réel recherchant la présence de la séquence du transgène *mpp75Aa1.1*. Elle permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne.

B.1.2.3. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Sur la base des éléments présentés par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » considère que :

- **une évaluation spécifique de la sécurité sanitaire des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 doit être conduite,**
- **la caractérisation moléculaire nécessite d'être complétée par la fourniture des données expérimentales d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275,**
- **une analyse complémentaire du risque d'effets hors cibles (off-target effects) par alignement de séquences de l'ARNdb *DvSnf7.1*, avec des bases de données de transcriptomes du maïs, de l'Homme, des insectes et de l'animal consommateur de maïs (fourrage et/ou grains) doit être réalisée. En cas d'identification de cibles potentielles, le pétitionnaire devra présenter les identités et les fonctions biologiques potentielles des cibles. Dans le cas où des gènes « cibles potentielles » seraient identifiés, le pétitionnaire devra présenter les identités et les fonctions biologiques potentielles des cibles et rechercher le niveau d'expression de ces gènes dans le maïs MON95275 et dans son comparateur quasi-isogénique non génétiquement modifié.**

Le GT « Biotechnologie » considère que les informations disponibles ne permettent pas de conclure sur la caractérisation moléculaire du maïs MON95275.

B.1.3. Évaluation comparative

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

Le maïs MON95275 est comparé à son témoin quasi-isogénique non transgénique dans le même fond génétique hybride LH244 x HCL617. Le pétitionnaire utilise aussi dix-sept variétés hybrides commerciales non génétiquement modifiées comme variétés de référence.

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

Les semences du maïs génétiquement modifié MON95275 et de son comparateur conventionnel quasi-isogénique LH244 × HCL617 ont été produites conjointement en 2019 à Hawaï, dans les mêmes conditions et selon des pratiques standard. Leur pureté a été vérifiée et des tests de germination effectués.

Les essais au champ se sont déroulés en 2019, sur huit sites représentant une diversité des conditions pédoclimatiques des régions de production du maïs aux États-Unis selon le pétitionnaire. Sur chaque site ont été cultivés le maïs génétiquement modifié MON95275, son comparateur quasi-isogénique non GM et quatre variétés commerciales de référence différentes parmi les 17 susmentionnées, dans un plan d'expérience en blocs randomisés avec quatre répétitions pour chaque matériel testé. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel OGM de l'EFSA (2011a, 2015).

L'analyse statistique a été conduite selon les lignes directrices de l'EFSA (EFSA, 2010a), testant pour chaque variable évaluée la différence du maïs MON95275 avec son comparateur conventionnel quasi-isogénique, et son équivalence avec les variétés commerciales de référence. 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. Le modèle statistique utilisé pour le calcul des limites de confiance est un modèle linéaire à effets mixtes incluant un effet fixe « génotype ». Les effets aléatoires retenus sont « sites », « bloc dans site » et « variété commerciale ». Un modèle est également utilisé pour étudier l'interaction génotype/site. Selon l'approche décrite par le panel GMO de l'EFSA (2010a), les variables évaluées sont classées en quatre catégories selon les résultats des tests d'équivalence et en sept types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

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

Les caractéristiques du plan d'expérience et de l'analyse statistique mise en œuvre respectent les recommandations du panel GMO de l'EFSA (2010a).

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

L'analyse de composition a été réalisée sur les grains et le fourrage. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE⁵ (OCDE, 2002).

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

B.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 63 composés sur 78 analysés (neuf dans le fourrage, 69 dans le grain) ont été utilisables pour l'analyse statistique, 15 composés ayant été considérés comme non-utilisables car plus de 50 % des données obtenues pour chacun de ces paramètres étaient inférieures à la limite de quantification : 13 acides gras, le sodium et le furfural.

Sur la base de ces résultats, l'analyse combinée de l'ensemble des 8 sites d'expérimentation montre que la composition des grains et du fourrage du maïs MON95275 est équivalente à celle des grains et du fourrage de variétés de référence de maïs.

⁵ Organisation de coopération et de développement économiques

B.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les dix caractéristiques agronomiques et phénotypiques recommandées par l'EFSA pour l'analyse comparative générique d'un maïs GM (EFSA, 2015) ont été évaluées. Neuf caractéristiques sont utilisables pour les analyses statistiques, le nombre d'épis par plante ne présentant pas de variabilité dans cette étude.

Le maïs MON95275 est équivalent aux variétés commerciales de référence pour l'ensemble de ces paramètres analysés.

Les interactions environnementales avec des stress biotiques (arthropodes, maladies) et stress abiotiques ont fait l'objet d'observations à quatre stades de développement. Ces essais au champ ont été réalisés dans des conditions de faible pression de stress biotiques et les observations n'ont pas mis en évidence de différences entre le maïs MON95275 et son comparateur non GM.

Concernant l'analyse des stress biotiques (maladies et dommages associés aux arthropodes), le GT « Biotechnologie » note que :

- la sélection des arthropodes et maladies analysés n'est pas justifiée. En particulier, les chrysomèles, organismes cibles du maïs MON95275, ne figurent pas parmi les arthropodes observés,
- l'analyse, effectuée pour chaque stress sous la forme d'un « nombre total d'observations sur l'ensemble des sites », comparé à un « nombre d'observations sans différences entre le maïs MON95275 et son comparateur conventionnel », n'est pas suffisamment documentée,
- une faible pression de stress biotiques est globalement observée, le nombre d'observations étant parfois insuffisant pour effectuer une analyse pertinente.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire :

- **de compléter son analyse comparative concernant les stress biotiques,**
- **de justifier la sélection des arthropodes et maladies analysés, préciser et justifier la nature et les dates des observations selon les stress étudiés.**

Le GT « Biotechnologie » considère que l'analyse comparative en termes de stress biotiques présentée dans ce dossier ne permet pas de conclure sur les différences entre le maïs MON95275 et son comparateur conventionnel.

Le pétitionnaire indique que les caractéristiques du pollen du maïs MON95275 ont été évaluées en laboratoire et mesurées comme se situant dans la fourchette de variabilité attendue pour les variétés de maïs mais l'étude correspondante n'est pas disponible dans le dossier.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de fournir cette étude sur le pollen du maïs MON95275.

B.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs MON95275 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

B.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, à l'exception de la synthèse des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et de l'ARNdb DvSnf7.1, le GT « Biotechnologie » considère que le maïs MON95275 est équivalent en composition aux variétés commerciales de référence.

Sur le plan agronomique et phénotypique, les analyses présentées n'ont pas mis en évidence de différences biologiquement significatives entre le maïs MON95275 et son comparateur quasi-isogénique dans des conditions de faible pression de stress biotiques.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de fournir l'étude des caractéristiques du pollen du maïs MON95275 et de compléter son analyse comparative des caractéristiques phénotypiques entre le maïs MON95275 et son comparateur quasi-isogénique vis-à-vis des stress biotiques.

B.1.4. Toxicologie

B.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le maïs MON95275 exprime les protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2, toxines bactériennes de la superfamille des β -PFP présentées dans le chapitre B.1.2.

Les protéines exogènes Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 n'ont jamais été produites par des plantes génétiquement modifiées autorisées en Europe. Le pétitionnaire (Kouadio *et al.*, 2021a et b) classe ces deux protéines dans la famille des « beta-pore-forming proteins », la protéine Mpp75Aa1.1 dans la sous-famille ETX-MTX2 (Epsilon toxin - Mosquitocidal toxin 2) et la protéine Vpb4Da2 dans la sous-famille « Bacterial_exotoxin_B protein ». Le pétitionnaire revendique un historique d'utilisation sûre de ces deux nouvelles protéines en s'appuyant principalement sur des données concernant des protéines insecticides d'autres sous-familles, en particulier les protéines CRY à trois domaines.

Le GT « Biotechnologie » considère que cet argumentaire n'est pas recevable et que les historiques de sécurité sanitaire d'utilisation présentés dans le dossier ne peuvent pas être utilisés pour les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2.

Les données de sécurité sur les organismes sources, les recherches bioinformatiques d'homologies de séquences entre les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et des séquences d'allergènes et de toxines connus, la dégradabilité de ces protéines par les enzymes digestives, la thermosensibilité de ces protéines et la teneur de ces protéines nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage ainsi que l'analyse faite par le GT « Biotechnologie » de ces données sont détaillées dans les sections sur l'allergénicité (section B.1.5) et sur la caractérisation moléculaire de la plante génétiquement modifiée (section B.1.2).

Le pétitionnaire ne présente aucune étude de toxicité sur les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 dans le dossier.

Conformément au Règlement (UE) n° 503/2013, le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire que des études de toxicité orale par gavage réitéré pendant 28 jours chez le rongeur soient conduites selon la ligne directrice OCDE 407 (OCDE, 2008), avec les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2.

Le pétitionnaire indique que la toxicité des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 a été démontrée contre la chrysomèle des racines du maïs *D. virgifera virgifera* (Kouadio 2021a et b) sans information supplémentaire en termes de spécificité. Il affirme que ces deux protéines agissent indépendamment sur les coléoptères, sans interaction synergique ou antagoniste.

Le GT « Biotechnologie » demande que le mode d'action des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ainsi que la spécificité de leurs activités insecticides vis-à-vis d'insectes cibles soient déterminés. Les interactions potentielles entre les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 devront aussi être argumentées.

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

Les gènes introduits dans le génome du maïs MON95275 n'ont pas pour objectif de modifier sa composition en dehors de la synthèse des protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et de l'ARNdb *DvSnf7.1*.

Le GT « Biotechnologie » considère que les informations sur l'ARNdb *DvSnf7.1* synthétisé par le maïs MON95275 ne sont pas suffisantes pour écarter un effet potentiel hors cible sur le transcriptome des consommateurs destinataires du maïs MON95275 (animaux de rente et Homme). Les demandes sur la recherche de potentiels effets hors cible (*off-target effects*) des petits ARN interférents (small interfering RNA, ARNsi) sont formulés au chapitre B.1.2.2.

Comme pour la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs MON87411 (Anses, 2019), le pétitionnaire fournit l'article de Petrick *et al.* (2016) portant sur une étude de toxicité orale pendant 28 jours chez la souris par gavage avec de l'ARNdb *DvSnf7*, dans les références bibliographiques transmises avec le dossier sur le maïs MON95275.

Des souris de la lignée CD-1 ont reçu par gavage quotidien de l'ARNdb produit dans *Escherichia coli* (*DvSnf7_968RNA*). L'équivalence entre l'ARNdb produit dans *Escherichia coli* et l'ARNdb exprimé dans le maïs MON87411 destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7* a été montrée (Urquhart *et al.*, 2015). Pour plusieurs paramètres toxicologiques importants, les analyses statistiques n'ont pas pu être réalisées faute d'effectifs suffisants dans les prélèvements sans explication du pétitionnaire sur ces absences. De plus, le protocole statistique a été modifié post-étude ce qui n'est pas conforme aux lignes directrices de l'OCDE 407 et les éventuels impacts de ces modifications n'ont pas été discutés.

Le GT « Biotechnologie » émet la même conclusion que lors de la précédente évaluation du maïs MON87411 (Anses, 2019) : cette étude de toxicité orale par administration répétée d'ARNdb pendant 28 jours chez la souris n'est pas considérée comme recevable et ce procédé expérimental semble peu susceptible de renseigner sur la sécurité sanitaire d'acides nucléiques.

B.1.4.3. Informations sur l'altération des teneurs en constituants 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 MON95275.

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

Conformément aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503-2013, une étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rat a été menée en 2019 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes pratiques de laboratoire (BPL).

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 MON95275,
- 33 % (p/p) de grains moulus de maïs de la variété génétiquement modifiée MON95275 auxquels s'ajoutent 17 % de maïs quasi-isogénique non GM (LH244 x HCL617),
- 50 % (p/p) de grains moulus de maïs quasi-isogénique non GM (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 sont présentées.

L'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours conduite avec l'aliment complet chez le rat n'a pas mis en évidence d'effets toxiques imputables au traitement dans les conditions de l'étude, ni de modifications macroscopiques ou histologiques imputables au traitement.

Néanmoins, le GT « Biotechnologie » note qu'une augmentation dose-dépendante pour la teneur en hormone thyroïdienne T3 est mise en évidence lorsque les animaux des deux sexes sont analysés ensemble. Toutefois, cette augmentation n'est pas corrélée avec des variations des teneurs en T4 et TSH et les teneurs en T3 restent dans la gamme des données historiques.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire présente une discussion relative à cette variation biologique.

Le calcul de puissance présenté par le pétitionnaire s'appuie sur seulement huit paramètres et des tailles d'effets sans justification (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 GT « Biotechnologie » considère que ces tailles d'effets ne sont pas appropriées et demande que le pétitionnaire présente un calcul de puissance avec des paramètres appropriés.

B.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Le GT « Biotechnologie » considère que :

- les historiques d'utilisation sûre présentés par le pétitionnaire pour les protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ne sont pas recevables,
- le mode d'action et la spécificité de l'activité insecticide vis-à-vis d'insectes cibles des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 doivent être déterminés et leurs interactions potentielles doivent être renseignées,
- des études de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur doivent être conduites avec les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2,
- l'étude de toxicité orale par administration répétée d'ARNdb *DvSnf7.1* pendant 28 jours chez la souris n'est pas recevable et ce procédé expérimental semble peu susceptible de renseigner sur la sécurité sanitaire d'acides nucléiques,
- la recherche d'effets hors cibles de l'ARNdb *DvSnf7.1* chez les consommateurs destinataires du maïs MON95275 n'a pas été réalisée,
- l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rat présentée ne permet pas de se prononcer sur la sécurité sanitaire des grains de maïs MON95275 en raison d'un calcul de puissance non approprié.

Le GT « Biotechnologie » n'est donc en mesure de se prononcer ni sur la sécurité sanitaire des protéines nouvellement exprimées Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2, ni sur la sécurité sanitaire du maïs MON95275.

B.1.5. Évaluation de l'allergénicité

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

Le potentiel allergénique des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 exprimées dans le maïs transgénique MON95275 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (EFSA, 2017), à savoir :

- l'innocuité des sources de protéines exprimées dans la PGM,
- l'absence d'identités globales et locales avec les allergènes d'une banque,
- la dégradation *in vitro* des protéines exprimées par la pepsine,
- la thermosensibilité des protéines exprimées,
- les faibles quantités de protéines exprimées dans la PGM.

Selon le pétitionnaire, l'innocuité et l'absence d'activité allergénique des sources respectives de Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2, *Brevibacillus laterosporus* et *Bacillus thuringiensis*, ont été montrées en raison de l'utilisation depuis de nombreuses années de *B. thuringiensis* en agriculture et de *B. laterosporus* en alimentation (fromages en particulier).

Les analyses bioinformatiques présentées par le pétitionnaire puis actualisées par le GT « Biotechnologie » montrent que les protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 ne présentent pas d'identités globales ou locales avec des allergènes (AD_2021, COMPARE-2022 et AllergenOnline-2022), ni avec des toxines avérées (TOX_2021) ou des peptides immunotoxiques responsables de la maladie cœliaque (CD_2021).

Les tests de résistance à la protéolyse pepsique et pancréatique montrent que les protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 sont rapidement dégradées en condition de digestion gastrique et intestinale simulées *in vitro*.

Les tests de résistance à la dénaturation thermique des protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 montrent que les deux protéines sont rapidement inactivées et en grande partie dénaturées, respectivement, à des températures supérieures ou égales à 75 °C et 55 °C.

L'étude détaillée des teneurs en protéines exprimées dans les grains révèle de faibles teneurs de l'ordre du µg/g de matière sèche pour les protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 (section B.1.2.2).

Les protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 exprimées dans le maïs MON95275 satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA et peuvent donc être considérées comme étant peu allergéniques. Le pétitionnaire estime, à juste titre, que ces protéines ne sont pas susceptibles de provoquer une réaction allergique ou une réponse immunotoxique chez les sujets atteints d'intolérance sévère au gluten.

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

Aucune information disponible ne laisse supposer que le maïs transgénique MON95275 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de maïs non génétiquement modifiées conventionnelles.

B.1.5.3. Propriété d'adjuvant

Aucune information disponible ne laisse supposer que les deux protéines nouvellement exprimées dans le maïs MON95275 puissent développer des propriétés adjuvantes.

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

Sur la base des données et des commentaires fournis par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » conclut que le potentiel allergénique des protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2, nouvellement exprimées dans le maïs MON95275, peut être considéré comme très faible. Les protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 n'ont apparemment ni de propriétés adjuvantes, ni de propriétés immunotoxiques vis-à-vis de malades souffrant de maladie cœliaque. Elles sont présentes en faible quantité dans les grains de maïs MON95275.

L'allergénicité du maïs MON95275 est probablement similaire à celle d'un maïs conventionnel.

B.1.6. Évaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le maïs MON95275 et des variétés de maïs de référence.

B.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 MON95275 pour l'humain et l'animal.

Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées dans les grains et dans le fourrage proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2019 pour caractériser le maïs MON95275 (section B.1.2.2.). Pour les grains, le pétitionnaire indique également avoir calculé des teneurs par masse de matière fraîche ; les teneurs respectives en Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 calculées sont de 1,1 et 1,0 µg/g de matière fraîche. Les teneurs en protéines Mpp75Aa1.1 et Vbp4Da2 dans le pollen sont en-dessous des limites de quantification qui sont après calcul par masse de matière fraîche, respectivement de 0,118 et 0,148 µg/g de matière fraîche.

L'estimation de la consommation journalière des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 par l'animal a été faite par le pétitionnaire sur la base des données de l'OCDE (2009) relatives à la consommation de maïs par les animaux d'élevage, les teneurs moyennes en protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 mesurées dans le fourrage et les grains du maïs MON95275, les teneurs moyennes calculées en protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 dans les « gluten feed » et « gluten meal » et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré étant du maïs MON95275).

En utilisant les données de l'OCDE (2009) et ce scénario du pire cas, le pétitionnaire estime que les moyennes des apports journaliers les plus élevés sont obtenus chez la vache en lactation et représente 0,008 % de l'apport protéique total de ces animaux pour la protéine Mpp75Aa1.1 (466 µg/kg p.c./jour) et 0,003 % de l'apport protéique total de ces animaux pour la protéine Vpb4Da2 (166 µg/kg p.c./jour).

Le GT « Biotechnologie » demande l'actualisation de ces calculs en utilisant les données les plus récentes de l'OCDE (2013).

Le pétitionnaire a réalisé en 2022 une étude sur les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 selon l'EFSA (2019). Les données de consommation aiguë et chronique des denrées sont issues des données de l'EFSA *Comprehensive European Food Consumption Database*⁶ pour les denrées à base de grains de maïs et pour les compléments alimentaires à base de pollen.

Le GT « Biotechnologie » indique que l'EFSA a mis au point un outil pour le calcul des expositions alimentaires de l'Homme sous forme de données dans un fichier Excel sur le maïs, mis à disposition sur le site de l'EFSA⁷.

Le GT demande au pétitionnaire de présenter un calcul des expositions alimentaires actualisé en utilisant cet outil conformément au document de l'EFSA relatif à l'évaluation de l'exposition alimentaire humaine aux protéines nouvellement exprimées dans les denrées issues de plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2019).

B.3. Caractérisation des risques

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

⁶ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>.

⁷ <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>.

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

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

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

B.5.1. Introduction

L'évaluation des risques pour l'environnement tient compte des champs d'application de la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs MON95275, à savoir l'importation, la transformation et tout usage destiné à l'alimentation humaine et animale attendu d'un maïs dans l'Union européenne, à l'exclusion de la culture. L'Union européenne comprend également des régions ultrapériphériques situées en zones tropicales plus propices à la persistance du maïs. C'est le cas pour certains des départements et régions d'outre-mer du territoire français.

Le GT « Biotechnologie » souhaite que les caractéristiques environnementales particulières de ces régions ultrapériphériques soient considérées dans l'évaluation des risques et les plans de surveillance des dossiers de mise sur le marché, dans l'Union européenne, de grains issus de plantes génétiquement modifiées.

B.5.2. Approche globale de l'ERE

Les résultats de l'évaluation moléculaire, de l'évaluation comparative de la composition et des caractères agronomiques et phénotypiques et l'étude de la germination n'ont pas montré de différence biologique autre que les traits recherchés de résistance aux insectes liés à l'expression des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et de l'ARNdb *DvSnf7.1*. Les seuls dangers à considérer sont donc ceux liés à l'expression de ces deux protéines insecticides et de cet ARNdb.

Les dangers pour l'environnement pourraient provenir de la persistance et du potentiel invasif du maïs MON95275. Concernant le potentiel invasif, la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec des téosintes n'est pas discutée par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire considère la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec des téosintes.

S'agissant d'une demande d'autorisation d'importation sans demande de culture, l'exposition de l'environnement est à considérer uniquement dans trois cas, selon les recommandations de l'EFSA (EFSA, 2010b) :

- une dispersion accidentelle de grains importés, lors de leur déchargement, de leur stockage ou de leur transport entre les sites d'importation et les sites de transformation ou d'utilisation,
- l'exposition aux fèces des animaux ayant consommé le maïs MON95275,
- l'exposition aux produits issus de l'utilisation ou de la transformation de ce maïs.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de prendre en compte la dispersion involontaire de grains de maïs génétiquement modifié dans l'environnement pouvant conduire au développement de plantes férales comme voie d'exposition environnementale.

B.5.3. Domaines spécifiques de risque

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

La dispersion du transgène dans l'environnement n'est possible que dans le cas d'une série d'événements successifs : dispersion involontaire de grains, par exemple lors du transport, dans un milieu qui permet la survie du grain puis sa germination et la croissance d'une plante capable de se reproduire. La littérature ne rapportant pas de développement de populations autonomes à partir de repousses ou plantes férales de maïs, la dispersion subséquente du transgène à partir de plantes férales issues de dispersion involontaire de grains nécessiterait des flux de gènes par pollen vers du maïs cultivé ou des téosintes. Seul le flux de gènes avec des téosintes serait susceptible d'introduire le transgène dans des populations adventices autonomes. La distribution géographique des populations de téosintes européennes est actuellement limitée à deux régions européennes [Aragon et Catalogne en Espagne et nord de la région Nouvelle Aquitaine en France (EFSA, 2016 et 2022)].

Le risque de dispersion des transgènes par un croisement avec des populations européennes de téosintes (*Zea mays* ssp. *Mexicana*) aurait dû être abordé de façon plus détaillée par le pétitionnaire sur la base de la littérature existante, passée en revue par l'EFSA (EFSA, 2016 et 2022).

Le potentiel avantage sélectif, en termes de résistance à des insectes cibles, qui pourrait être conféré à des plantes de maïs férales ou à des téosintes adventices suite à un flux de gènes du maïs MON95275 n'est pas abordé par le pétitionnaire. Ce risque devrait être discuté en lien avec les données de la littérature sur le statut et la distribution géographique des populations introduites de *Diabrotica virgifera virgifera* en Europe (Bažok *et al.*, 2021).

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de compléter son analyse des caractéristiques du pollen du maïs MON95275, de considérer le risque de flux de gènes du maïs MON95275 vers des populations de téosintes présentes dans les environnements récepteurs de l'Union européenne et de discuter de l'avantage sélectif de ces populations conféré par les transgènes selon la distribution locale de l'insecte ravageur du maïs *D. virgifera virgifera*.

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

La caractérisation moléculaire du maïs MON95275 et en particulier les analyses bioinformatiques montrent qu'une recombinaison homologue entre des séquences de l'ADN-T inséré dans le maïs MON95275 et de l'ADN génomique de microorganismes est improbable. Elle permet de conclure que la probabilité de transfert des gènes du maïs MON95275 à des micro-organismes est très faible.

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

Les organismes cibles selon le pétitionnaire sont les insectes ravageurs du maïs *Diabrotica barberi* et *Diabrotica virgifera virgifera*, tous deux connus sous le nom de « chrysomèle des racines du maïs ». Si la première espèce semble restreinte à l'Amérique du Nord, la seconde est invasive dans l'Union européenne ; aujourd'hui, elle est présente dans 21 pays européens suite à plusieurs événements d'introduction sur des sites aéroportuaires par des vols en provenance d'Amérique du Nord. En France, la zone concernée est encore relativement localisée (Alsace et Rhône-Alpes) et l'infestation est contrôlée par un système de rotations des cultures (Bažok *et al.*, 2021).

La problématique considérée est la possibilité que les organismes cibles contournent la résistance du maïs MON95275 en développant une résistance aux protéines insecticides Mpp75Aa1 et Vpb4Da2 et à l'ARNdb *Dvsnf7.1*.

Le pétitionnaire écarte la possibilité d'un développement de résistance des coléoptères cibles aux protéines insecticides et à l'ARNdb par l'argumentaire de l'exposition négligeable escomptée dans l'Union européenne dans le cadre d'une importation.

Dans ce contexte, l'exposition doit être considérée et caractérisée seulement après la formulation du problème et la caractérisation des dangers. Dans le cadre de la caractérisation des dangers, une réflexion sur la spécificité et le mode d'action des protéines insecticides en jeu est à fournir. La caractérisation de la spécificité de l'ARNdb *DvSnf7* est fournie mais la

détermination des niveaux d'expression du transgène dans les différents tissus du maïs MON95275 est manquante.

Le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de mieux caractériser le risque de développement de résistance des coléoptères aux molécules insecticides produites par le maïs MON95275.

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

Du fait du périmètre de la demande, circonscrit à l'importation, la transformation et l'alimentation humaine et animale, l'exposition des organismes non-cibles au maïs MON95275 et aux produits dérivés est limitée aux trois possibles voies décrites en B.5.2.

Comme pour les organismes cibles, le GT « Biotechnologie » reconnaît que la limitation des voies d'exposition en conditions d'importation par rapport à des conditions de culture réduit considérablement les risques potentiels concernant les organismes non-cibles, mais l'argument de l'exposition ne devrait pas minimiser les autres aspects de la formulation du problème et de la caractérisation des dangers, le risque étant la résultante de la combinaison de la gravité du danger avec l'ampleur de l'exposition.

Pour évaluer l'impact potentiel du maïs MON95275 sur les organismes non-cibles par les voies d'exposition identifiées, il serait nécessaire de disposer d'une information sur la toxicité de l'activité insecticide des produits des transgènes, ainsi que sur leur niveau d'expression dans les différents tissus du maïs MON95275 et leur dégradabilité selon les contextes.

Le dossier ne fournit pas de données concernant le mode d'action et le profil de spécificité des protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2.

L'ARNdb *Snf7* a fait l'objet d'une étude de spécificité (Bachman *et al.*, 2013) ainsi que d'une analyse de risque écologique, notamment en termes de toxicité vis-à-vis de nombreux organismes non-cibles, sans qu'aucun effet néfaste n'ait été identifié à la concentration environnementale d'ARNdb *Snf7* maximale attendue pour le maïs MON87411 (Bachman *et al.*, 2016).

Le GT « Biotechnologie » considère que la première étude est recevable mais la seconde ne peut être directement transposée au MON95275. Pour rappel, le maïs MON87411 exprime l'ARNdb *DvSnf7* dans une construction similaire à celle de *DvSnf7.1* du maïs MON95275, à ceci près que les séquences diffèrent dans leur promoteur. Considérant que les niveaux d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* n'ont pas été caractérisés dans le maïs MON95275, le GT « Biotechnologie » estime que les résultats observés pour le maïs MON87411 ne sont pas transposables au maïs MON95275. Il demande que les niveaux d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275 soient quantifiés, comme cela a été fait pour le maïs MON87411 (Bachman *et al.*, 2016).

Par ailleurs, le pétitionnaire a quantifié les protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 dans différents tissus du maïs MON95275, mais il n'explore pas les conséquences possibles de ces niveaux d'expression sur les organismes non-cibles, notamment les herbivores et leurs prédateurs.

Concernant la plante entière, le pétitionnaire cite les études réalisées dans le cadre de l'analyse comparative pour souligner qu'aucune différence n'a été observée entre le maïs MON95275 et son comparateur non GM en termes de dommages causés par des arthropodes. Le GT « Biotechnologie » estime que les arthropodes observés ne sont pas représentatifs de tous les organismes non-cibles possiblement affectés, et que cette étude ne peut être considérée comme un test recevable sur des organismes non-cibles (section B.1.3.5).

Enfin, considérant que les protéines insecticides sont dégradées par les enzymes digestives selon des tests *in vitro* (section B.1.5.1), le pétitionnaire conclut que l'exposition à ces protéines

par l'intermédiaire des fèces sera limitée. Rien n'est dit de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans ce contexte, sa dégradation n'ayant pas été documentée.

Le GT « Biotechnologie » demande que la caractérisation des dangers pour les organismes non-cibles soit approfondie, notamment en ce qui concerne les modes d'action et la spécificité des protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2, ainsi que la quantification de l'ARNdb dans le maïs MON95275 et une analyse de son devenir dans les fèces des animaux nourris avec ce maïs.

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

Le GT « Biotechnologie » formule les demandes correspondantes pour les domaines de risques suivants :

Concernant la persistance et le caractère envahissant, y compris le transfert de gènes entre plantes, le GT « Biotechnologie » demande au pétitionnaire de mieux considérer (1) l'exposition environnementale associée aux possibles plantes férales de maïs MON95275 issues de la dispersion involontaire de grains importés, (2) le fait que l'Union européenne comprend des régions ultrapériphériques situées en zones tropicales plus propices à la persistance du maïs que les régions de climat tempéré classiquement considérées, et (3) le risque de dispersion des transgènes par l'intermédiaire d'un flux de gènes à partir de plantes férales de maïs MON95275 vers des populations de téosintes adventices présentes dans les environnements récepteurs de l'Union européenne, avec la nécessité de discuter de l'avantage sélectif conféré aux téosintes par les transgènes selon la distribution locale de *D. virgifera virgifera* et ses conséquences.

Concernant les interactions de la PGM avec les organismes cibles, le GT « Biotechnologie » reconnaît qu'en situation d'importation, les conditions de faible pression de sélection ne sont pas favorables au développement local d'une résistance chez les organismes cibles, mais vu le passé d'introductions répétées de chrysomèles dans l'Union européenne par transport aérien, il demande de considérer les conséquences éventuelles, pour l'Union européenne, d'un développement de populations résistantes dans les pays cultivateurs exportateurs. Dans ce contexte, un argumentaire sur l'évaluation de ce risque dans les pays cultivateurs et les mesures de gestion associées est demandé.

Concernant les interactions de la PGM avec les organismes non-cibles, le GT « Biotechnologie » considère que l'évaluation de l'impact du maïs MON95275 sur les organismes non-cibles par les voies d'exposition identifiées nécessite une meilleure caractérisation (1) de la toxicité de la plante et des produits qu'elle exprime (non concluante pour la plante entière et manquante pour les protéines insecticides), (2) de la spécificité de leur mode d'action (manquante pour les protéines insecticides), (3) de leurs niveaux d'expression dans les différents tissus de la plante (manquants pour l'ARNdb *DvSnf7.1*), (4) de leur dégradabilité selon les contextes (manquante pour l'ARNdb *DvSnf7.1*).

En l'état actuel du dossier, le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de conclure sur les risques environnementaux associés à la mise sur le marché du maïs MON95275 et des produits qui en seront issus ou en contiendront, à des fins d'importation, transformation et utilisation dans l'alimentation humaine et animale.

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

B.6.2. Surveillance spécifique (cas par cas)

N'ayant pas identifié de risques d'effets indésirables potentiels sur l'environnement dans le contexte des utilisations prévues du maïs MON95275, le pétitionnaire estime qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une surveillance spécifique.

Le GT « Biotechnologie » anticipe que, du fait de la limitation du périmètre d'exposition environnementale aux voies d'importation, les réponses attendues aux manques identifiés dans le dossier initial ne seront vraisemblablement pas de nature à entraîner la mise en œuvre d'une surveillance spécifique.

B.6.3. Surveillance générale d'effets néfastes non anticipés

Le plan de surveillance générale proposé par le pétitionnaire est conforme aux principes et objectifs définis dans la directive 2001/18/CE et au document d'orientation *ad hoc* de l'EFSA (EFSA, 2011b).

Le GT « Biotechnologie » estime que le plan de surveillance générale exposé dans le dossier est conforme aux recommandations de l'EFSA (EFSA, 2011b).

Le GT « Biotechnologie » rappelle que les procédures visant à limiter les pertes et déversement de grains mentionnés dans le plan de surveillance générale des effets sur l'environnement devront être respectées par l'ensemble des opérateurs manipulant la marchandise.

Dans le cas d'évènements de dispersion accidentelle de grains de maïs MON95275 importés, qui pourraient se produire suite à des pertes pendant le transport, le chargement ou le déchargement de la marchandise viable sur le territoire de l'Union européenne, le GT estime que des mesures de gestion doivent viser à limiter tout risque de formation de repousses de maïs GM dans l'environnement.

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

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature scientifique sur la période 2012-2022, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Suite à la recherche dans les bases de données, une seule publication est retenue parmi les 1081 publications initialement identifiées. Elle est cependant exclue considérant que le maïs génétiquement modifié n'est pas le maïs MON95275.

Le GT « Biotechnologie » considère que la recherche bibliographique appliquée pour cette analyse de la littérature devrait être moins restrictive puisqu'elle conduit, suite au crible initial à ne pas retenir les articles concernant les protéines insecticides Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et l'ARNdb *DvSnf7.1* ainsi que le maïs MON87411 qui exprime l'ARNdb *DvSnf7*.

De plus, le GT demande au pétitionnaire de fournir une analyse de la littérature sur les effets cible et hors cible des ARNdb.

C. Conclusions du groupe de travail « Biotechnologie »

Considérant que :

- des données expérimentales d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275 sont attendues afin de vérifier l'identité des ARNdb *DvSnf7.1* et *DvSnf7* et de connaître le niveau d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* ;
- une analyse complémentaire du risque d'effets hors cibles (off-target effects) par alignement de séquences de l'ARNdb *DvSnf7.1*, avec des bases de données de transcriptomes du maïs, de l'Homme, des insectes et de l'animal consommateur de maïs (fourrage et/ou grains) doit être réalisée ;
- une présentation des modes d'action des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et de l'ARNdb *DvSnf7.1* et des spécificités de leurs activités insecticides vis-à-vis d'insectes cibles doit être fournie ainsi qu'une analyse des interactions potentielles entre les deux protéines ;

- les données sur l'évaluation des caractéristiques du pollen du maïs MON95275 sont attendues ;
- des compléments doivent être apportés sur l'analyse comparative des caractéristiques phénotypiques entre le maïs MON95275 et son comparateur quasi-isogénique vis-à-vis des stress biotiques ;
- aucune analyse de la toxicité des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 par gavage réitéré pendant 28 jours chez le rongeur n'est fournie par le pétitionnaire, alors que les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ne sont exprimées par aucune autre plante transgénique autorisée en Union européenne ;
- l'analyse de l'étude de toxicité orale à dose répétée pendant 90 jours chez le rat avec un aliment contenant du maïs MON95275 n'est pas recevable ;
- l'évaluation des risques environnementaux ne prend pas en compte la téosinte, et n'envisage pas l'avantage sélectif conféré par les transgènes selon la distribution locale de *Diabrotica virgifera virgifera*,

le « GT Biotechnologie » estime ne pas pouvoir se prononcer sur la sécurité sanitaire et environnementale du maïs MON95275.

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

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie », qui considère qu'en l'absence de certaines données déterminantes, il ne peut se prononcer sur les risques sanitaires et environnementaux relatifs à l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du maïs MON95275.

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

Pr. Benoît VALLET

MOTS-CLÉS

OGM, PGM, maïs MON95275, résistance, insectes, chrysomèles des racines du maïs, coléoptères, extinction de gènes par interférence ARN, Mpp75Aa1.1, Vpb4Da2, DvSnf7.1
GMO, GMP, MON95275 maize, insect resistance, northern corn rootworm, western corn rootworm, coleoptera, RNAi silencing, Mpp75Aa1.1, Vpb4Da2, DvSnf7.1

BIBLIOGRAPHIE

Alves G.G., Machado de Avila R.A., Chavez-Olortgui C.D., Lobato F.C. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, 30. pp. 102-107.

Anses. 2015. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 10 novembre 2015 relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées et aux aliments pour animaux génétiquement modifiés, du maïs génétiquement modifié MON87411, développé pour être résistant à certains insectes et tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2015-124). Saisine 2015-SA-0195.

Anses. 2019. Avis de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 23 janvier 2019 relatif à l'évaluation de certaines données complémentaires relatives au maïs génétiquement modifié MON 87411 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2015-124). Saisine n° 2018-SA-0141.

Bachman P.M., Bolognesi R., Moar W.J., Mueller G.M., Paradise M. S., Ramaseshadri P., Tan J., Uffman J.P., Warren J., Wiggins B.E., Levine S.L. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic research* 22: 1207-1222.

Bachman P.M., Huizinga K.M., Jensen P.D., Mueller G., Tan J., Uffman J.P., Levine S.L. 2016. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81: 77-88.

Bažok R, Lemic D; Chiarini F, Furlan L. 2021. Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) in Europe: current status and sustainable pest management. *Insects* 12, 195. doi.org/10.3390/insects12030195.

Décision d'exécution (UE) n° 2019/1308 de la Commission du 26 juillet 2019 autorisant la mise sur le marché de produits contenant du maïs génétiquement modifié MON 87411 (MON-87411-9), consistant en ce maïs ou produits à partir de celui-ci, en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil. JOUE du 2 août 2019, L 204/pp. 85-89.

Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil – Déclaration de la Commission. JO L 106 du 17 avril 2001, pp. 1-39.

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

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

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

- EFSA. 2011b. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific Opinion on guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. EFSA Journal, 9, 2316, 40 pp.
- EFSA. 2015. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants. EFSA Journal, 13, 4128, 44 pp.
- EFSA. 2016. Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA supporting publication, 1094, 13 pp.
- EFSA. 2017. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants. EFSA Journal, 15, 4862, 49 pp.
- EFSA. 2019. Statement on the human dietary exposure assessment to newly expressed proteins in GM foods. EFSA Journal 17 (7):5802, 18 pp.
- EFSA. 2022. Statement on the update of environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations of EFSA (2016) on EU teosinte. EFSA Journal 20(4):7228, 40 pp.
- Hofmann F, Otto M, Wosniok W. 2014. Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation-results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). Environmental Sciences Europe, 26, 24. doi.org/10.1186/s12302-014-0024-3.
- ISAAA. 2019. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019: Biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier." ISAAA brief N° 55. ISAAA:Ithaca, NY.
- Kouadio J.-L., Duff S., Aikins M., Zheng M., Rydel T., Chen D., Bretsnyder E., Xia C., Zhang J., Milligan J., Evdokimov A., Nageotte J., Yin Y., Moar W., Giddings K., Park Y., Jerga A., Haas J. 2021a. Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a putative beta-pore forming protein from *Brevibacillus laterosporus* active against the western corn rootworm. PLoS ONE 16, e0258052.
- Kouadio J.-L., Zheng M., Aikins M., Duda D., Duff S., Chen D., Zhang J., Milligan J., Taylor C., Mamanella P., Rydel T., Kessenich C., Panosian T., Yin Y., Moar W., Giddings K., Park Y., Jerga A., Haas J. 2021b. Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. PLoS One, 16, 1-23.
- Le Corre V, Siol M, Vigouroux Y, Tenailon MI, Délye C. 2020. Adaptive introgression from maize has facilitated the establishment of teosinte as a noxious weed in Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 117, 25618–25627. doi: 10.1073/pnas.2006633117.
- Lu J, Lu J, He L. 2019. Modeling and estimation of pollen-mediated gene flow at the landscape scale. Ecological Indicators 106, 105500. doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105500.
- NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).
- OCDE. 1998. Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.
- 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, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

Petrick JS, Frierdich GE, Carleton S, Kessenich CR, Silvanovich A, Zhang Y, Koch MS. 2016. Corn rootworm-active RNA DvSnf7: Repeat dose oral toxicology assessment in support of human and mammalian safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81:57-68.

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 (CE) n°396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil. JO L 70 du 16.3. 2005, pp. 1-16.

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.

Urquhart W, Mueller GM., Carleton S, Song Z, Perez T, Uffman JP., Jensen PD., Levine SL and Ward J. 2015. A novel method of demonstrating the molecular and functional equivalence between *in vitro* and plant-produced double-stranded RNA. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1-6.

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

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, du maïs génétiquement modifié MON95275, développé pour être résistant à certains coléoptères, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-173). Maisons-Alfort : Anses, 37 p.

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

concernant la demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du maïs génétiquement modifié MON95275 développé pour avoir une résistance à certains coléoptères pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM

Dossier n° EFSA-GMO-NL-2022-173

A. Informations générales

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

B. Informations scientifiques

1. Identification et caractérisation des dangers

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

1.1.5.2. Compatibilité sexuelle avec d'autres espèces, cultivées ou sauvages

- Potentiel pour une pollinisation croisée avec des variétés cultivées de maïs

Le pétitionnaire mentionne que le flux de gènes via le pollen est le plus important dans les premiers mètres puis décroît rapidement avec la distance ; la distance d'isolement utilisée habituellement étant de 200 mètres. Cependant, les études mettant en évidence l'existence de flux de gènes à longue distance sont manquantes dans le dossier, en particulier selon la direction des vents dominants et lorsque la taille de la source est importante (Lu *et al.*, 2019). La distance maximale rapportée dans la littérature pour le flux de gènes par pollen entre parcelles de maïs est de 4,45 km (Hofmann *et al.*, 2014).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de mieux tenir compte de la littérature scientifique disponible concernant les conditions d'occurrence de flux de gènes à longue distance du maïs.

- Hybridation avec des espèces annuelles du sous-genre *Zea mays* ssp. *mexicana*

La littérature citée est incomplète ; les études concernant les populations de téosintes adventices en Europe ne sont pas citées. Le pétitionnaire mentionne que les hybrides entre la téosinte et le maïs cultivé ont un phénotype intermédiaire, ce qui réduirait substantiellement le risque d'établissement de populations adventices. Cependant, des populations adventices de téosintes sont bien observées dans les parcelles de maïs en France et en Espagne, où elles se maintiennent depuis plusieurs années (plus de 30 ans en France) (Trtikova *et al.*, 2017 ; Diaz *et al.*, 2020 ; Le Corre *et al.*, 2020).

L'introgression de gènes de maïs dans la téosinte est considérée comme improbable par le pétitionnaire, alors qu'elle a été démontrée pour les populations de téosintes françaises, celles-ci ayant introgressé spontanément un gène de résistance à un herbicide présent dans des variétés de maïs cultivées en France (Le Corre *et al.*, 2020).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de mieux prendre en compte la présence de populations de téosintes adventices dans l'Union européenne et la possibilité d'introgression de gènes de maïs dans la téosinte, documentées dans la littérature scientifique.

1.1.5.4. Dissémination

Modes et ampleur de la dissémination

L'analyse du risque de dispersion involontaire lors du transport de grains de maïs entre les ports d'importation et les sites de stockage ou de transformation devrait être davantage détaillée en prenant en compte des données de la littérature. Des plants de maïs transgéniques issues de la dispersion involontaire de grains lors de leur transport depuis les ports d'importation ont été observées en Corée du sud (Lee *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2009 ; Han *et al.*, 2014). Des plants de maïs spontanées, non génétiquement modifiées, ont été observées dans une zone portuaire en Autriche (Pascher, 2016).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de mieux prendre en compte le risque de dispersion involontaire de grains de maïs MON95275 suite à une importation, en particulier lors des opérations de transport et de stockage, en s'appuyant sur la littérature scientifique existante.

1.2. Caractérisation moléculaire

1.2.1. Informations concernant la modification génétique

Le maïs MON95275 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome :

- les gènes *Mpp75Aa1.1* et *vpb4Da2* codant les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ayant des propriétés insecticides conférant au maïs MON95275 la résistance à certains coléoptères ;
- la cassette d'expression d'un ARN double brin (ARNdb) destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7.1* de *Diabrotica virgifera virgifera* par un mécanisme d'ARN interférence (ARNi) dans le but de conférer à la plante la résistance à cet insecte.

La cassette d'expression d'un ARNdb destiné à inhiber l'expression du gène *DvSnf7* est aussi présente dans le maïs MON87411 (décision d'autorisation de la Commission européenne du 26 juillet 2019). Le pétitionnaire indique que la cassette d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* présente dans le maïs MON95275 est identique à celle de l'ARNdb *DvSnf7* du maïs MON87411 pour la séquence inversée répétée de l'ARN mais diffère au niveau de la séquence promotrice. Une séquence « enhancer » pLIIG-Zm1 a été ajoutée avant le promoteur constitutif du gène de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ainsi qu'une séquence de 55 pb

à la suite de ce promoteur, 46 pb de plus que pour le maïs MON87411. Le but de ces modifications est d'augmenter l'expression de l'ARNdb afin d'améliorer l'efficacité insecticide dans le maïs MON95275.

Le pétitionnaire cite des analyses par northern blot sur l'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275 sans fournir ces études. Il se base sur ces études pour affirmer que les évaluations de la sécurité réalisées pour l'ARNdb *DvSnf7* exprimé dans le maïs MON87411 sont applicables à l'ARNdb *DvSnf7.1* exprimé dans le maïs MON95275.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande la fourniture des données expérimentales d'expression de l'ARNdb *DvSnf7.1* dans le maïs MON95275.

1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le pétitionnaire a recherché l'expression des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 dans divers tissus du maïs MON95275 mais pas celle de l'ARNdb *DvSnf.1*, renvoyant pour celui-ci aux données de son expression dans le maïs MON87411.

En raison des modifications des séquences promotrices de l'ARNdb *DvSnf7.1*, le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère qu'il est nécessaire de rechercher l'ARNdb et les petits ARN interférents (ARNsi) issus de son clivage dans les différents tissus du maïs MON95275.

L'évaluation des potentiels effets hors cible (off-target effects) des petits ARN interférents (small interfering RNA, ARNsi) s'appuie dans le dossier sur la recherche d'une identité partielle de séquences entre l'ARNsi et un ARNm cellulaire. La séquence nucléotidique du gène *DvSnf7.1* a été comparée au transcriptome de maïs. L'analyse *in silico* (fenêtre glissante de 21 nucléotides) réalisée révèle une absence d'identité de séquence entre les ARNsi et le transcriptome.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que les informations sur la production de l'ARNdb par le maïs MON95275 ne sont pas suffisantes pour écarter un effet potentiel d'extinction d'expression de gène(s) (« silencing ») chez le maïs et ses consommateurs. Le GT demande que des analyses bioinformatiques complémentaires soient réalisées et fournies avec les transcriptomes des consommateurs destinataires du maïs MON95275 (animaux de rente et Homme) et que, dans cette analyse, des paramètres moins contraignants soient appliqués (hypothèse d'un « mésappariement ») y compris avec le transcriptome de maïs. Dans le cas où des gènes « cibles potentielles » seraient identifiés, il serait nécessaire de rechercher le niveau d'expression de ces gènes dans le maïs MON95275 et dans son témoin isogénique.

1.2.3 Informations complémentaires concernant la plante génétiquement modifiée vis-à-vis des aspects de sécurité environnementale

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

1.3. Analyse comparative

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

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

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

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

1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

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

1.3.4. Analyse comparative de la composition

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

1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Il est mentionné dans la section 5.2.2.3 que les caractéristiques du pollen ont été évaluées en laboratoire et mesurées comme se situant dans la fourchette de variabilité attendue pour les variétés de maïs, mais l'étude correspondante n'est pas disponible dans le dossier.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de fournir cette étude.

Concernant l'analyse des stress biotiques (maladies et dommages associés aux arthropodes), le GT « Biotechnologie » de l'Anses note que :

- La sélection des arthropodes et maladies analysés n'est pas justifiée. En particulier, les chrysomèles, organismes cibles du maïs MON95275, ne figurent pas parmi les arthropodes observés ;
- L'analyse, effectuée pour chaque stress sous la forme d'un « nombre total d'observations sur l'ensemble des sites », comparé à un « nombre d'observations sans différences entre le maïs MON95275 et son comparateur conventionnel », n'est pas suffisamment documentée ;
- Un insecticide et un fongicide sont utilisés *a priori* sur l'ensemble des sites, sans explications ni commentaires par rapport au suivi d'un éventuel itinéraire technique standard ou par rapport à leur impact sur les stress biotiques analysés. Les données brutes mentionnent par ailleurs que l'OGM n'a pas été traité, sans précision concernant les comparateur et variétés de référence, entraînant une confusion dans ce qui a été effectivement traité et comparé ;
- Une faible pression de stress biotiques est globalement observée, le nombre d'observations étant parfois insuffisant pour effectuer une analyse statistique pertinente.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de clarifier son évaluation des caractéristiques du pollen du maïs MON95275 et de compléter son analyse comparative concernant les stress biotiques.

Le GT demande au pétitionnaire de justifier la sélection des arthropodes et maladies analysés, préciser et justifier la nature et les dates des observations selon les stress étudiés, préciser et justifier les traitements insecticide et fongicide utilisés sur le maïs MON95275, son comparateur et les variétés de référence, et prendre en compte leur impact sur le développement des stress biotiques et l'analyse comparative associée. En l'état, l'analyse effectuée ne permet pas de conclure sur les différences entre le maïs MON95275 et son comparateur conventionnel en termes de stress biotiques.

1.3.6. Effets de la transformation

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

1.3.7 Conclusions de l'analyse comparative

Les informations mises à disposition dans le dossier initial du pétitionnaire pour la composition des grains et du fourrage n'appellent pas de commentaire de la part du groupe de travail (GT) « Biotechnologie » de l'Anses.

En synthèse, sur le plan agronomique et phénotypique, le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de clarifier son évaluation des caractéristiques du pollen du maïs MON95275 et de compléter son analyse comparative concernant les stress biotiques.

1.4. Toxicologie

1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Les protéines exogènes Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 sont deux nouvelles protéines qui n'ont jamais été produites par des plantes génétiquement modifiées autorisées en Europe. Le pétitionnaire (Kouadio *et al.*, 2021 a et b) classe ces deux protéines dans la famille des « beta-pore-forming proteins », la protéine Mpp75Aa1.1 dans la sous-famille ETX-MTX2 (Epsilon toxin - Mosquitocidal toxin 2) et la protéine Vpb4Da2 dans la sous-famille « Bacterial_exotoxin_B protein ». Le pétitionnaire présente un historique d'utilisation sûre de ces deux nouvelles protéines en s'appuyant principalement sur des données concernant des protéines insecticides d'autres sous-familles, en particulier les protéines Cry à trois domaines.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère l'historique d'utilisation sûre présenté dans le dossier initial comme insuffisant. Le mode d'action des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 ainsi que la spécificité de leur activité insecticide vis-à-vis d'insectes cibles doivent être déterminés.

Le GT demande au pétitionnaire que des études de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur soient conduites selon la ligne directrice OCDE 407, avec les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2. Les interactions potentielles entre les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 devront aussi être argumentées.

1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

Comme pour la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs MON87411 (Anses, 2019), le pétitionnaire a fourni l'article de Petrick *et al.* (2016) portant sur une étude de toxicité orale pendant 28 jours chez la souris par administration répétée d'ARNdb DvSnf7, dans les références bibliographiques transmises avec le dossier sur le maïs MON95275.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses émet la même conclusion que lors de la précédente évaluation (Anses, 2019) : cette étude de toxicité orale par administration répétée d'ARNdb pendant 28 jours chez la souris n'est pas considérée comme recevable et ce procédé expérimental semble peu susceptible de renseigner sur la sécurité sanitaire d'acides nucléiques.

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

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

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

Une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur a été menée avec deux doses (33 % et 50 % de grains moulus de maïs).

Une augmentation dose dépendante pour la teneur en hormone thyroïdienne T3 est mise en évidence lorsque les animaux des deux sexes sont analysés ensemble. Toutefois, cette augmentation n'est pas corrélée avec des variations des teneurs en T4 et TSH et les teneurs en T3 restent dans la gamme des données historiques.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire discute cette variation biologique.

Le calcul de puissance présenté par le pétitionnaire s'appuie sur seulement huit paramètres et des tailles d'effets sans justification (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine). **Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que ces tailles d'effets ne sont pas appropriées.** Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire présente un calcul de puissance avec des paramètres appropriés.

1.5. Evaluation de l'allergénicité

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

1.6. Evaluation nutritionnelle

1.6.1. Évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires génétiquement modifiées

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

1.6.2. Évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux génétiquement modifiés

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

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

Le pétitionnaire a réalisé en 2022 une étude sur les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 selon l'EFSA (2019). Les données de consommation aiguë et chronique des denrées sont issues des données de l'EFSA *Comprehensive European Food Consumption Database*¹ pour les denrées à base de grains de maïs et pour les compléments alimentaires à base de pollen.

¹ <http://www.efsa.europa.eu/en/datex/foododb/datexfooddb.htm>

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses indique que l'EFSA a mis au point un outil pour le calcul des expositions alimentaires de l'Homme sous forme de données dans un fichier Excel sur le maïs mis à disposition sur le site de l'EFSA².

Le GT demande au pétitionnaire de présenter un calcul des expositions alimentaires actualisé en utilisant cet outil conformément au document de l'Efsa relatif à l'évaluation de l'exposition alimentaire humaine aux protéines nouvellement exprimées dans les aliments génétiquement modifiés (2019).

L'estimation de la consommation journalière des protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 par l'animal a été faite par le pétitionnaire sur la base des données de l'OCDE (2009) relatives à la consommation de maïs par les animaux d'élevage, les teneurs moyennes en protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 mesurées dans le fourrage et les grains de maïs MON95275, les teneurs moyennes calculées en protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 dans les « gluten feed » et « gluten meal » et un scénario du pire cas (tout le maïs consommé est considéré étant du maïs MON95275).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande l'actualisation de ces calculs en utilisant les données de l'OCDE (2013).

3. Caractérisation des risques

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

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

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

5. Evaluation des risques pour l'environnement (ERA)

5.1. Introduction

Remarque d'ordre général :

Le dossier ne se réfère qu'à une importation dans les régions de l'Union européenne de climat tempéré. Or, l'Union européenne comprend également des régions ultrapériphériques situées en zones tropicales plus propices à la persistance du maïs. C'est le cas pour certains des départements et régions d'outre-mer du territoire français³.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses souhaite que les caractéristiques environnementales particulières de ces régions soient considérées dans l'évaluation des risques et les plans de surveillance des dossiers de mise sur le marché, dans l'Union européenne, de grains issus de plantes génétiquement modifiées.

² <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/gmo/tools>

³ Les régions ultrapériphériques (RUP) sont les territoires de l'Union européenne situés hors du continent européen. Les décisions de l'Union européenne y sont appliquées. Les RUP françaises regroupent l'ensemble des DROM ou départements et régions d'outre-mer (Guadeloupe, Guyane, Martinique, La Réunion, Mayotte) ainsi que la collectivité d'outre-mer Saint-Martin.

5.2. Approche globale de l'ERA

5.2.1 Caractéristiques du maïs (*Zea mays* L.) pertinentes pour cette évaluation des risques

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

5.2.2 Identification des dangers potentiels à partir de la caractérisation des plantes et de l'évaluation comparative

Il est mentionné que les caractéristiques du pollen ont été évaluées en laboratoire et mesurées comme se situant dans la fourchette de variabilité attendue pour les variétés de maïs. Aucune étude concernant le pollen n'est décrite dans la section 1.3.5 sur l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de fournir et clarifier son évaluation des caractéristiques du pollen du maïs MON95275 et de compléter son analyse comparative concernant les stress biotiques.

5.2.3 Caractérisation des dangers

Les dangers pourraient provenir de la persistance et du potentiel invasif du maïs MON95275. Concernant le potentiel invasif, la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec des espèces sauvages (téosintes) n'est pas discutée par le pétitionnaire.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que le pétitionnaire considère la dispersion involontaire des transgènes par croisement avec des téosintes.

5.2.4. Caractérisation de l'exposition

L'affirmation du pétitionnaire concernant la dispersion involontaire des grains importés sur les sites d'importation, stockage et transport, « *Environmental conditions at these sites are unlikely to be conducive to germination, growth and reproduction of maize destined for food and feed use* » serait à nuancer au vu de la littérature existante sur les cas de dispersion ayant conduit à la présence de plantes férales en Corée du sud (Lee *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2009 ; Han *et al.*, 2014) et en Autriche (Pascher, 2016).

Par ailleurs, même si le niveau d'exposition est limité, la caractérisation des différentes voies possibles d'exposition des arthropodes doit être documentée.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de mieux prendre en compte la dispersion involontaire de grains dans l'environnement pouvant conduire au développement de plantes férales comme voie d'exposition environnementale.

5.2.5. Caractérisation des risques

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

5.2.6. Incertitudes

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

5.3. Domaines spécifiques de risque

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

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que l'équivalence du pollen du maïs MON95275 avec celui d'un maïs conventionnel n'a pas été démontrée aux sections 5.2.2.3 ou 1.3.5.

Le risque de dispersion des transgènes par un croisement avec des populations européennes de téosintes aurait dû être abordé de façon plus détaillée par le pétitionnaire sur la base de la littérature existante, passée en revue par l'EFSA (EFSA, 2016 et 2022).

Le potentiel avantage sélectif, en termes de résistance à des insectes cibles, qui pourrait être conféré à des plantes de maïs férales ou à des téosintes adventices suite à un flux de gènes du maïs MON95275 n'est pas abordé par le pétitionnaire. Ce risque devrait être discuté en lien avec les données de la littérature sur le statut et la distribution géographique des populations introduites de *Diabrotica virgifera virgifera* en Europe (Bažok *et al.*, 2021).

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de compléter son analyse des caractéristiques du pollen du maïs MON95275, de considérer le risque de dispersion des transgènes par l'intermédiaire d'un flux de gènes vers des populations de téosintes adventices présentes dans les environnements récepteurs de l'Union européenne et de discuter de l'avantage sélectif conféré par les transgènes selon la distribution locale de *D. virgifera virgifera*.

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

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

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

La problématique du développement de résistance des coléoptères cibles aux protéines insecticides et à l'ARNdb est écartée par l'argumentaire de l'exposition négligeable escomptée dans l'Union européenne dans le cadre d'une importation.

Si le GT « Biotechnologie » de l'Anses s'accorde sur le fait qu'en situation d'importation, les conditions ne sont pas favorables au développement d'une résistance chez les organismes cibles, l'exposition ne devrait être considérée et caractérisée qu'après la formulation du problème et la caractérisation du danger.

Dans le cadre de la caractérisation du danger, une réflexion sur la spécificité et le mode d'action des protéines insecticides en jeu est à fournir.

Une réflexion doit également être conduite pour l'ARNdb. Si le dossier est plus fourni en termes de caractérisation de la spécificité de *DvSnf7*, la détermination des niveaux d'expression du transgène dans les différents tissus du maïs MON95275 est manquante.

Enfin, considérant que les populations européennes de chrysomèles résultent de plusieurs événements d'introduction dont certains par transport aérien (Bažok *et al.*, 2021), il est également demandé au pétitionnaire d'examiner les conséquences éventuelles, pour l'Union européenne, que pourrait avoir le développement de populations résistantes dans les pays cultivateurs exportateurs. Dans ce cadre, un argumentaire sur l'évaluation de ce risque dans les pays cultivateurs et les mesures de gestion associées devra être ajouté au dossier.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande au pétitionnaire de mieux caractériser le risque de développement de résistance des chrysomèles aux molécules insecticides produites par le maïs MON95275.

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

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses demande que la caractérisation des dangers pour les organismes non-cibles soit approfondie, notamment en ce qui concerne les modes d'action et la spécificité des protéines insecticides, ainsi que la quantification de l'ARNdb dans le maïs MON95275 et une analyse de son devenir dans les fèces des animaux nourris avec ce maïs.

5.3.5. Incidence des techniques spécifiques de culture, de gestion et de récolte

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

5.3.6. Effets sur les processus biogéochimiques

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

5.3.7. Effets sur la santé humaine et animale

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

5.3.8 Evaluation globale du risque et conclusions

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

6. Plan de surveillance des effets sur l'environnement consécutive à la mise sur le marché (Post-Market Environmental Monitoring, PMEM)

6.1. Interrelation entre l'évaluation des risques pour l'environnement et la surveillance

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

6.2. Surveillance spécifique (cas par cas)

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

6.3. Surveillance générale d'effets néfastes non anticipés

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

6.4. Etablissement des rapports de surveillance

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

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

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2012-2022, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Suite à la recherche dans les bases de données, une seule publication est retenue parmi les 1081 publications ; elle est exclue après analyse parce que le maïs génétiquement modifié n'est pas le maïs MON95275.

Le GT « Biotechnologie » de l'Anses considère que la limitation de la recherche bibliographique appliquée pour cette analyse de la littérature devrait être moins restrictive puisqu'elle conduit, suite au crible initial (sans analyse par les reviewers), à ne pas retenir les articles concernant les protéines Mpp75Aa1.1 et Vpb4Da2 et l'ARNdb Snf7.1 ainsi que le maïs MON87411 qui exprime l'ARNdb Snf7.

Le GT demande au pétitionnaire de fournir une analyse de la littérature sur les effets cible et hors cible des ARNdb.

Références

Anses (2019) Avis de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) du 23 janvier 2019 relatif à l'évaluation de certaines données complémentaires relatives au maïs génétiquement modifié MON 87411 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2015-124). Saisine n° 2018-SA-0141.

Bažok R, Lemic D; Chiarini F, Furlan L (2021) Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) in Europe: current status and sustainable pest management. *Insects* 12, 195. <https://doi.org/10.3390/insects12030195>.

Décision d'exécution (UE) n° 2019/1308 de la Commission du 26 juillet 2019 autorisant la mise sur le marché de produits contenant du maïs génétiquement modifié MON 87411 (MON-87411-9), consistant en ce maïs ou produits à partir de celui-ci, en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil. JOUE du 2 août 2019, L 204/pp. 85-89.

Díaz A Taberner A, Vilaplán L (2020) The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 67, 225–239. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00828-z> (0123456789).-volV()0123456789.

EFSA (2016) Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA Supporting publication 2016:EN-1094.

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

EFSA (2022) Statement on the update of environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations of EFSA (2016) on EU teosinte. *EFSA Journal* 20(4):7228, 40 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7228>.

Han SM, Kim DY, Uddin MR, Hwang KS, Lee B, Kim CG, Park KW (2014). Appearance/instance of genetically modified maize at grain receiving harbors and along transportation routes in Korea. *Weed Turfgrass Science* 3, 221–224. doi: 10.5660/WTS.2014.3.3.221.

Hofmann F, Otto M, Wosniok W (2014) Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation-results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). *Environ. Sci. Eur.* 26, 24. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0024-3>.

Kouadio, J.-L., Duff, S., Aikins, M., Zheng, M., Rydel, T., Chen, D., Bretsnyder, E., Xia, C., Zhang, J., Milligan, J., Evdokimov, A., Nageotte, J., Yin, Y., Moar, W., Giddings, K., Park, Y., Jerga, A., Haas, J. (2021a) Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a putative beta-pore forming protein from *Brevibacillus laterosporus* active against the western corn rootworm. *PLoS ONE* 16, e0258052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258052>.

Kouadio, J.-L., Zheng, M., Aikins, M., Duda, D., Duff, S., Chen, D., Zhang, J., Milligan, J., Taylor, C., Mamanella, P., Rydel, T., Kessenich, C., Panosian, T., Yin, Y., Moar, W., Giddings, K., Park, Y., Jerga, A., Haas, J. (2021b) Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. *PLoS ONE* 16, e0260532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260532>.

Le Corre V, Siol M, Vigouroux Y, Tenaillon MI, Délye C (2020) Adaptive introgression from maize has facilitated the establishment of teosinte as a noxious weed in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 117, 25618–25627. Doi: 10.1073/pnas.2006633117.

Lee B, Kim CG, Park JY, Park KW, Kim HJ, Yi H, et al. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea. *Food Control* 20, 250–254. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.05.006.

Lu J, Lu J, He L (2019) Modeling and estimation of pollen-mediated gene flow at the landscape scale. *Ecological Indicators* 106, 105500. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105500>.

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, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

Park KW, Lee B, Kim CG, Kim DY, Park JY, Ko EM, Jeong SC, Choi KH, Yoon WK, Kim HM (2009) Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea. *Food Control* 21, 456–461. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.006.

Pascher K (2016) Spread of volunteer and feral maize plants in Central Europe: recent data from Austria. *Environmental Sciences Europe* 28 : 30. DOI 10.1186/s12302-016-0098-1.

Petrick JS, Friedrich GE, Carleton S, Kessenich CR, Silvanovich A, Zhang Y and Koch MS (2016) Corn rootworm-active RNA DvSnf7: Repeat dose oral toxicology assessment in support of human and mammalian safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81:57-68.

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.

Trtikova M, Lohn A, Binimelis R, Chapela I, Oehen B, Zemp N, Widmer A, Hilbeck A (2017) Teosinte in Europe—searching for the origin of a novel weed. *Scientific Reports* 7, 1560. DOI:10.1038/s41598-017-01478-w.

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