

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 25 juillet 2019

AVIS

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

**relatif à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des plantes
génétiquement modifiées, au regard notamment du développement de plantes
génétiquement modifiées contenant des événements de transformation empilés**

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.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Les abréviations et définitions figurent en annexe 1 de ce document.

1.1. « Panorama » réglementaire

Les premières initiatives visant à encadrer l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) datent du début des années 90. Au niveau international, la Convention sur la diversité biologique a été adoptée le 05 juin 1992 à Rio de Janeiro, lors de la Conférence des Nations unies sur l'environnement et le développement (CNUED). Entrée en vigueur le 29 décembre 1993, cette convention a offert un cadre pour le développement du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques, adopté le 29 janvier 2000. Ce protocole constitue le premier accord instituant un cadre réglementaire à l'échelle internationale pour concilier les impératifs commerciaux et la protection de l'environnement en regard de l'utilisation croissante des biotechnologies. Un mécanisme appelé Centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques (CEPRB)¹ a ensuite été créé par ce protocole, pour faciliter l'échange d'informations relatives aux OGM et aider les Parties au protocole à mieux respecter leurs obligations. Il fournit un accès mondial à une vaste gamme d'informations scientifiques,

¹ <http://bch.cbd.int/>

techniques, environnementales, légales et sur le renforcement des capacités à participer au CEPRB dans les six langues des Nations unies.

En Europe, un cadre réglementaire a également été mis en place dès le début des années 90, avec notamment la directive 90/220/CEE du Conseil du 23 avril 1990 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement.

La réglementation européenne est en constante évolution et repose aujourd'hui principalement sur :

- la directive 2009/41/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés ;
- la 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 ;
- le 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.

La directive 2001/18/CE donne dans son article 2 la définition d'un OGM, avec une liste de techniques considérées comme entraînant une modification génétique (annexe IA, première partie) et une liste de techniques qui ne sont pas considérées comme entraînant une modification génétique (annexe IA, deuxième partie). Elle précise également les exemptions (article 3), c'est-à-dire les organismes auxquels la directive ne s'applique pas, avec la liste des techniques concernées (annexe IB), dont la mutagenèse fait partie².

Le dispositif réglementaire européen a ensuite été complété par le 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. Entré en vigueur fin juin 2013, il détaille les informations et études que le demandeur d'une autorisation de mise sur le marché doit fournir pour l'évaluation scientifique réalisée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

Pour les aspects toxicologiques, ce règlement prévoit notamment l'obligation de fournir une étude par administration orale de l'aliment génétiquement modifié (GM) entier à des rongeurs pendant 90 jours. L'article 12 de ce règlement prévoyait le réexamen de cette obligation en juin 2016, sur la base des nouvelles données scientifiques et notamment des résultats d'un projet de recherche financé au niveau européen par le septième programme-cadre de recherche (FP7), désigné par l'acronyme GRACE (GMO Risk Assessment and Communication of Evidence). En février 2017, la Commission a estimé que, dans l'état actuel des connaissances scientifiques, il semble difficile de modifier le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, dans la mesure où l'obligation de réaliser cette étude constitue un bon équilibre entre le principe de précaution et la garantie d'un niveau élevé de sécurité.

² Ce sujet fait actuellement l'objet de débats, en lien avec le développement des variétés tolérantes aux herbicides non transgéniques (VTH) et des nouvelles techniques de modification du génome (NBT), telles que CRISPR-Cas9. Questionnée sur le statut d'exemption de la mutagenèse, la Cour de justice de l'Union européenne (CJUE) a considéré, dans son arrêt du 25 juillet 2018 (affaire C-528/16), que tous les organismes obtenus au moyen de techniques/méthodes de mutagenèse constituent des OGM et que ne sont exclus du champ d'application de la directive 2001/18/CE que les organismes obtenus au moyen de techniques/méthodes de mutagenèse qui ont été traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps. La CJUE indique également que les États membres peuvent soumettre de tels organismes aux obligations prévues par la directive 2001/18/CE ou à d'autres obligations, dans le respect du droit de l'Union, en particulier des règles relatives à la libre circulation des marchandises édictées aux articles 34 à 36 du traité sur le fonctionnement de l'Union européenne (TFUE). La décision attendue du Conseil d'Etat devrait apporter des éléments nouveaux, susceptibles de modifier le statut réglementaire des VTH et de préciser celui des organismes obtenus à l'aide des NBT en France.

Concernant les plantes génétiquement modifiées (PGM) obtenues par croisement(s) conventionnel(s) de PGM à événement de transformation simple, dénommées « PGM contenant des événements de transformation empilés » dans la suite du document, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que :

- le demandeur doit fournir une évaluation des risques présentés par chaque événement de transformation simple, ou bien faire référence aux demandes d'autorisation de mise sur le marché précédemment introduites pour ces événements ;
- l'évaluation des risques doit comporter une évaluation de chacun des aspects suivants :
 - stabilité des événements de transformation ;
 - expression des événements de transformation ;
 - effets potentiels (synergies ou antagonismes) résultant de la combinaison des événements de transformation, ces effets faisant l'objet d'une évaluation conforme aux points 1.4 (toxicologie), 1.5 (allergénicité) et 1.6 (évaluation nutritionnelle) du règlement ;
- pour les PGM contenant des événements de transformation empilés dont la culture est associée à la production de matériel contenant plusieurs sous-combinaisons d'événements de transformation, la demande doit porter sur chaque sous-combinaison qui n'a pas encore été autorisée, quelle qu'en soit l'origine. Le demandeur doit étayer par une motivation scientifique l'inutilité de fournir des données expérimentales à propos des sous-combinaisons concernées ou, en l'absence de motivation scientifiquement étayée, fournir ces données. Pour les PGM dont la culture n'aboutit pas à la production de matériel contenant plusieurs combinaisons d'événements de transformation, la demande doit porter uniquement sur la combinaison destinée à être mise sur le marché.

Cette réglementation européenne relative aux PGM contenant des événements de transformation empilés contraste avec la réglementation en vigueur aux Etats-Unis, au Canada, en Australie et Nouvelle-Zélande et au Japon :

- aux Etats-Unis et au Canada, aucune autorisation séparée ou additionnelle n'est nécessaire pour commercialiser des PGM contenant des événements de transformation empilés produites par croisement de PGM déjà autorisées³ et ⁴. La seule exception concerne les PGM qui comportent plusieurs gènes destinés à protéger la plante (« plant incorporated protectants » (PIPs)), pour lesquelles l'US Environmental Protection Agency (US EPA) peut demander une évaluation de la sécurité, dans la mesure où la combinaison des PIPs peut avoir pour conséquence une augmentation ou une modification de la toxicité⁵ ;
- en Australie et Nouvelle-Zélande, aucune demande d'autorisation n'est requise pour des PGM contenant des événements de transformation empilés issues du croisement de PGM à événement de transformation simple qui bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché et sont inscrites à l'annexe 26 de l'Australia New Zealand Food Standards Code⁶. En revanche, si l'une des PGM parentales n'est pas autorisée, alors une évaluation du risque préalable à la mise sur le marché doit être réalisée pour la PGM contenant les événements de transformation empilés ;
- au Japon, aucune donnée n'est requise si la PGM contenant des événements de transformation empilés combine des caractères qui ne changent pas le métabolisme de la plante hôte (catégorie 1), tels que des tolérances à des herbicides ou des résistances à des insectes communes (exemples : tolérance au glufosinate-ammonium ou résistance(s) à des insectes obtenue(s) en introduisant le gène *pat* ou un (des) gène(s) *cry* dans le génome de la plante). Pour les autres catégories de caractères (catégorie 2 ou 3, qui ont un impact sur le

³ <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/BiotechnologyProductsatCVMAnimalsandAnimalFood/ucm520998.htm>, consulté le 19/02/2019.

⁴ <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/general-public/overview/eng/1338187581090/1338188593891>, consulté le 19/02/2019.

⁵ <https://www.epa.gov/regulation-biotechnology-under-tsca-and-fifra>, consulté le 19/02/2019.

⁶ <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/gmfood/stackedgene/Pages/default.aspx>, consulté le 19/02/2019.

métabolisme de la plante ou produisent de nouvelles substances, respectivement), une évaluation préalable à la mise sur le marché est requise et le champ de l'évaluation dépend de la nature des caractères qui sont combinés⁷. Cette démarche différenciée est relativement récente, car avant 2014, toutes les PGM contenant des événements de transformation empilés faisaient l'objet d'une évaluation (Food Safety Commission of Japan 2016).

1.2. Champ de la saisine

La saisine porte uniquement sur les OGM obtenus par transgénèse, car à l'heure actuelle, les VTH et les organismes obtenus à l'aide des NBT ne font pas l'objet d'une évaluation préalable à leur mise sur le marché européen (Cf. note de bas de page n° 1 concernant le statut réglementaire des VTH et des organismes obtenus à l'aide des NBT). De plus, les travaux ne portent pas sur tous les OGM, mais uniquement sur les PGM, *i.e.* les microorganismes et les animaux génétiquement modifiés sont hors du champ de cette saisine. Par ailleurs, seuls sont présentés les éléments relatifs à l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM, l'évaluation des risques pour l'environnement étant du ressort du Haut Conseil des biotechnologies (HCB). Enfin, concernant les PGM tolérantes à un (des) herbicide(s), les questions liées au métabolisme de l'herbicide (des herbicides) et aux teneurs de ses (leurs) résidus dans la plante sont régies par le règlement (CE) n° 396/2005 et n'entrent pas dans le champ de cette saisine.

Très peu de temps après la création des premières PGM à événement de transformation simple, les industriels ont développé des PGM contenant plusieurs événements de transformation en réalisant des croisements conventionnels entre plusieurs PGM à événement de transformation simple. L'objectif de cette démarche est d'obtenir dans une même plante la combinaison des caractères apportés par chacun des parents utilisés dans le(s) croisement(s). Jusqu'à la fin des années 2000, ces PGM contenant des événements de transformation empilés étaient issues du croisement de deux ou trois PGM à événement de transformation simple. Depuis cette date, le nombre de PGM utilisées dans les croisements a tendance à augmenter, jusqu'à six pour le maïs Bt11 x MIR162 x MIR604 x 1507 x 5307 x GA21, dont la demande d'autorisation de mise sur le marché européen au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 a été déposée en 2011 (dossier n° EFSA-GMO-DE-2011-103).

Confronté depuis le début des années 2000 à l'évaluation du risque sanitaire lié à l'utilisation en alimentation humaine et animale de PGM contenant des événements de transformation empilés, dans un contexte d'évolution constante de la réglementation et des recommandations de l'EFSA, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » a élaboré une démarche pour évaluer ces PGM. Elle est décrite dans la première partie de cet avis.

Au cours de ce travail de réflexion, les experts du GT « Biotechnologie » se sont interrogés sur l'éventualité que des interactions aient lieu entre les événements empilés, sur le plan moléculaire, protéique ou métabolique, ainsi que sur les moyens qui permettraient de mettre en évidence ces interactions et d'en évaluer les effets sur la santé après consommation par l'Homme ou l'animal. Ces travaux ont abouti à des propositions pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM, à événement de transformation simple ou contenant des événements de transformation empilés. Ces propositions tiennent compte des limites des méthodes utilisées à l'heure actuelle et des possibilités offertes par l'évolution des connaissances et des techniques, dans les domaines de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la métabolomique notamment. Elles sont présentées dans la deuxième partie de cet avis.

⁷ http://www.fsc.go.jp/english/what_we_do.html, consulté le 19/02/2019.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

La liste des experts du GT « Biotechnologie » qui ont contribué aux travaux figure en annexe 2 de ce document. Une première étape de l'expertise collective a été réalisée par le GT « Biotechnologie », réuni le 21 juillet 2016, sur la base d'un travail initial en sous-groupes, auquel tous les experts ont contribué entre novembre 2014 et février 2016, puis d'un rapport de synthèse élaboré à partir des propositions de chaque sous-groupe. Ce rapport a été présenté et discuté lors des réunions du GT « Biotechnologie » des 19 mai, 16 juin et 21 juillet 2016. Un travail a ensuite été réalisé en interne à l'Anses, à la Direction de l'évaluation des risques, au sein de l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments, afin de proposer une version du document enrichie d'éléments discutés au cours de différentes réunions du GT « Biotechnologie » et qui n'avaient pas été intégrés dans le rapport de synthèse initial. Une deuxième étape de l'expertise collective a été réalisée au cours des réunions du GT « Biotechnologie » des 17 janvier et 21 février 2019, au cours desquelles ce document a été présenté, discuté puis validé.

Les travaux portant sur la méthode d'expertise, ils ont ensuite été présentés au CES « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK), auquel le GT « Biotechnologie » est rattaché, lors des réunions des 27 juin et 9 juillet 2019, au cours desquelles ils ont été discutés puis endossés à l'unanimité.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL

Partie I - Démarche du GT « Biotechnologie » pour évaluer les PGM contenant des événements de transformation empilés

Confronté depuis le début des années 2000 à l'évaluation de demandes d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, de PGM contenant des événements de transformation empilés, le GT « Biotechnologie » a élaboré la démarche suivante pour évaluer la sécurité sanitaire de ces PGM :

Étape 1 : ne peuvent être considérées pour l'examen que les PGM contenant des événements de transformation empilés issues du croisement de PGM à événement de transformation simple qui ont reçu un avis favorable de l'Afssa ou de l'Anses, à l'issue d'une évaluation complète : caractérisation moléculaire, évaluation comparative de la composition et des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, toxicologie (incluant une étude de toxicité par administration répétée pendant 90 jours chez le rongeur), allergénicité et évaluation nutritionnelle. Une exception peut être admise pour certaines des premières PGM autorisées, car elles ont bénéficié d'un avis favorable de l'Afssa à une époque où l'évaluation des PGM reposait sur des critères différents de ceux utilisés actuellement.

Étape 2 : en plus de la caractérisation moléculaire et de l'évaluation comparative de la PGM contenant des événements de transformation empilés, le dossier doit présenter un argumentaire consolidé, incluant les données de la littérature et tout autre élément dont le pétitionnaire dispose, à l'appui de l'absence d'interaction entre les événements empilés pouvant avoir un impact négatif sur la santé humaine ou animale. Le GT « Biotechnologie » a conduit une réflexion concernant

l'évaluation des interactions entre les protéines nouvellement exprimées et les constituants de la plante. S'agissant de perspectives à long terme, n'ayant pas conduit à des propositions d'évolutions du cadre actuel de l'évaluation des risques sanitaires des PGM, le résultat de ces réflexions figure en annexe 3 de ce document.

Etape 3 : si l'évaluation comparative de la PGM contenant les événements de transformation empilés permet de démontrer l'équivalence de cette PGM avec des variétés non génétiquement modifiées, l'évaluation nutritionnelle n'est pas demandée. Dans le cas contraire, une étude d'alimentarité sur espèce cible (poulet le plus souvent) est requise.

A l'avenir, le GT « Biotechnologie » ajoutera les éléments suivants dans sa démarche :

- si l'argumentaire fourni par le pétitionnaire concernant l'absence d'interaction (étape 2) est insuffisant, ou en cas de suspicion d'interactions, une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur d'un mélange des protéines nouvellement exprimées dans la PGM sera requise ;
- toute interférence supposée avec les principales fonctions physiologiques chez l'Homme ou l'animal pourra justifier la demande de compléments d'investigations.

Concernant les sous-combinaisons de PGM contenant des événements de transformation empilés (Cf. 1.1., page 3), le GT « Biotechnologie » estime que, lorsque ces sous-combinaisons n'ont pas fait l'objet d'une évaluation dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 et qu'aucune donnée n'est disponible les concernant, il ne peut pas se prononcer sur leur sécurité sanitaire.

La seule exception à cette règle concerne les dix sous-combinaisons du maïs Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, au sujet desquelles le GT « Biotechnologie » a conclu de la manière suivante (Anses, 2016) :

« Le GT « Biotechnologie » considère que les conclusions de l'avis rendu par l'Afssa le 22 octobre 2009 sur le maïs Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 (Afssa, 2009a) peuvent être étendues aux dix sous-combinaisons qui sont désormais visées dans la demande d'autorisation.

Le GT « Biotechnologie » souligne toutefois que dans le cas de la production, par sélection classique, de variétés correspondant aux différentes sous-combinaisons, cette conclusion est subordonnée à la garantie que les événements de transformation utilisés dans les croisements sont identiques (séquences des inserts et position de ces séquences dans le génome de la plante) à ceux qui ont été évalués et disposent d'une autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003. Par ailleurs, cette conclusion ne s'applique qu'au maïs Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21. Enfin, le GT « Biotechnologie » rappelle que si des maïs contenant un (des) gène(s) de tolérance à un (des) herbicide(s) venaient à être importés, ils devraient satisfaire à la réglementation relative à l'utilisation des produits phytosanitaires sur ce type de plantes. ».

Cette conclusion est fondée sur les éléments suivants :

- les quatre maïs parentaux et cinq sous-combinaisons du maïs Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 ont été évalués par l'Afssa ou l'Anses dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003. L'Agence a conclu que ces maïs et leurs produits dérivés présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les maïs conventionnels et leurs produits dérivés (Afssa, 2005, 2006, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d, 2008e et 2009b ; Anses, 2010). Ces maïs ont également fait l'objet d'avis favorables du Panel GMO de l'EFSA (EFSA GMO Panel 2007, 2009a, b, c, 2010a, b, c, 2012) et ils sont autorisés au titre du règlement (CE) n° 1829/2003, à l'exception du maïs Bt11 x MIR162 x GA21, dont le dossier a été retiré par le pétitionnaire ;

- l'intégrité et la stabilité des inserts ont été étudiés sur plusieurs générations, tant chez les parents et l'hybride Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 que chez les cinq sous-combinaisons précédemment évaluées par l'Afssa ou l'Anses, dont trois comportaient deux événements de transformation et deux comportaient trois événements. Dans la mesure où chaque maïs parental est présent dans au moins une de ces sous-combinaisons et où les résultats permettent de conclure à la stabilité des inserts, on peut raisonnablement considérer qu'il en sera de même dans les sous-combinaisons qui n'ont pas été évaluées. Toutefois, dans le cas de la production par sélection classique de variétés correspondant aux différentes sous-combinaisons, cette conclusion reste assujettie à la garantie que les événements de transformation utilisés dans les croisements sont identiques (séquences des inserts et position de ces séquences dans le génome de la plante) à ceux qui ont été évalués et disposent d'une autorisation de mise sur le marché ;

- les évaluations de l'hybride Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, des maïs parentaux et des cinq sous-combinaisons précédemment évaluées par l'Afssa ou l'Anses ont également porté sur l'analyse comparative de la composition et des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, sans qu'il soit mis en évidence de différence pouvant laisser supposer un risque sanitaire lié à la consommation de ces produits. De même, l'évaluation toxicologique de ces maïs n'est pas évocatrice d'un risque pour la santé humaine ou animale. Les protéines nouvellement exprimées sont présentes à des teneurs similaires dans tous ces maïs et elles sont rapidement dégradées dans le système digestif humain. Le risque d'interactions entre ces protéines pouvant avoir un effet délétère sur la santé humaine et animale semble limité, dans la mesure où l'évaluation de plusieurs combinaisons de ces protéines n'a pas mis en évidence de risque identifiable. Enfin, le maïs n'est pas considéré comme un aliment allergénique majeur et les évaluations évoquées précédemment ne laissent pas supposer que ces maïs puissent présenter une allergénicité différente de celle des variétés de maïs conventionnelles.

Partie II - Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM

II.1. Propositions portant sur la caractérisation moléculaire des PGM

II.1.1. Démarche actuelle pour la caractérisation moléculaire des PGM

En Europe, les fondements de la caractérisation moléculaire des PGM ont été établis dès la mise en place de la directive 90/220/CEE. Tout en conservant les mêmes principes, les réglementations ultérieures (directive 2001/18/CE et règlement (CE) n° 1829/2003) et les documents guides du Panel GMO de l'EFSA (EFSA GMO Panel 2006, 2011) sont venus préciser et surtout davantage expliciter les exigences concernant les informations et études à fournir. Enfin, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, largement inspiré du document guide du Panel GMO de l'EFSA (2011), fixe que la caractérisation moléculaire doit porter sur :

- la modification génétique : description des méthodes utilisées, nature et source du vecteur utilisé, source(s) du (des) acide(s) nucléique(s) utilisé(s) pour la transformation et taille et fonction recherchée de chaque fragment constitutif de la région destinée à être insérée ;
- la plante génétiquement modifiée : description générale du (des) caractère(s) introduit(s) ou modifié(s), informations sur les séquences effectivement insérées ou supprimées et sur l'expression du (des) insert(s), stabilité génétique de l'insert (des inserts), stabilité phénotypique de la PGM et risques potentiels associés au transfert horizontal de gènes⁸.

⁸ Ce règlement prévoit également la fourniture d'informations complémentaires pour l'évaluation des risques pour l'environnement. Elles ne sont pas détaillées ici, l'évaluation des risques pour l'environnement étant du ressort du HCB.

Cela nécessite de déterminer :

- la nature, la taille et le nombre de copies des fragments d'ADN intégrés dans le génome de la PGM. Ces aspects sont le plus souvent documentés par des études de type « Southern blot » (Southern 1975). Brièvement, l'ADN issu de la PGM et ceux de témoins appropriés sont digérés par différentes enzymes de restriction et des hybridations sont réalisées avec des sondes correspondant à des éléments de l'ADN-T, afin de déterminer le nombre d'insertions et de vérifier l'impact du transfert sur l'intégrité de l'ADN-T, ainsi qu'avec des sondes correspondant au squelette du vecteur, afin de vérifier l'absence d'intégration de ces séquences dans le génome de la PGM ;
- la séquence de l'insert (des inserts), ainsi que la séquence sur environ 1 kb des régions flanquantes en 5' et 3' de l'insert (des inserts). Ces analyses permettent de vérifier l'intégrité des éléments constituant l'insert (les inserts) et d'identifier l'apparition éventuelle de mutations ponctuelles (SNP) et/ou d'insertions/délétions (indels) dans leur séquence. Elles permettent également de déterminer si la transformation génétique s'est accompagnée de modifications involontaires du génome de la plante receveuse (indels, interruptions de gènes, etc.) au niveau du (des) site(s) d'insertion de l'insert (des inserts). Enfin, elles permettent de détecter la création éventuelle de nouveaux cadres ouverts de lecture (ORF)⁹ et d'en évaluer les conséquences à l'aide d'analyses bioinformatiques (recherche de similarités de séquence entre l'ORF (les ORF) nouvellement créé(s) et les toxines et les allergènes répertoriés dans des bases de données). En fonction des informations recueillies, il peut être nécessaire de procéder à des analyses supplémentaires (une analyse de la transcription, par exemple, pour vérifier si la création de nouvelles ORF conduit à la transcription de nouveaux ARN messagers), afin de compléter l'évaluation des risques ;
- la concentration de la (des) protéine(s) résultant de l'expression du (des) transgène(s) dans différents tissus ou organes prélevés à différents stades de développement de la plante. Les données doivent provenir d'au moins trois sites de culture, ou d'un seul site sur au moins trois périodes de végétation. Dans tous les cas, des données relatives aux niveaux d'expression dans les parties de la plante destinées à l'alimentation humaine ou animale doivent être fournies. Des informations sur l'expression dans d'autres parties de la plante sont requises en cas d'utilisation de promoteurs spécifiques à certains tissus, lorsque ces informations présentent un intérêt pour l'évaluation de la sécurité de la PGM. Lorsque la nature de l'insert le justifie (exemples : extinction d'un gène ou modification intentionnelle de voies biochimiques), l'ARN (les ARN) ou métabolites spécifiquement concernés doivent être analysés. Enfin, lorsque l'extinction de gène(s) est obtenue par ARN interférence (ARNi), les effets potentiels sur d'autres gènes que le gène cible (« effets hors cible ») doivent être évalués par une analyse *in silico* ;
- la stabilité génétique de l'insert (des inserts) et la stabilité phénotypique de la PGM, en réalisant le même type d'analyses que précédemment sur plusieurs générations et en analysant la ségrégation du (des) transgène(s) et du (des) caractère(s) introduit(s) dans la PGM avec les méthodes statistiques appropriées.

Concernant les PGM contenant des événements de transformation empilés, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que :

- la sécurité des interactions éventuelles entre toute modification non recherchée à chaque site d'insertion doit être évaluée ;
- le demandeur doit fournir des données sur les teneurs des protéines résultant de l'expression des transgènes et/ou sur l'expression des caractères résultant de la modification génétique (l'extinction d'un gène, par exemple), afin d'évaluer les interactions éventuelles entre les événements de transformation. Cette évaluation doit se fonder sur des données obtenues à partir de plantes cultivées dans les mêmes essais au champ. Des informations

⁹ ORF créés par la modification génétique, soit aux jonctions entre le(s) insert(s) et le génome de la plante, soit en raison de réarrangements internes de l'insert (des inserts).

complémentaires peuvent être nécessaires au cas par cas lorsque des problèmes sont décelés ;

- le demandeur doit fournir des informations permettant d'établir que, dans la PGM contenant les événements de transformation empilés, chacun des événements de transformation a des caractéristiques moléculaires identiques à celles des événements de transformation simples contenus dans les PGM parentales. Les événements de transformation empilés doivent être comparés avec les événements de transformation parentaux à l'aide de matériels végétaux représentatifs des matériels destinés à la production commerciale. Le demandeur doit dûment motiver le choix des matériels végétaux utilisés. Les comparaisons doivent porter notamment sur les séquences des inserts et des régions flanquantes obtenues à partir de PGM contenant les événements simples et de PGM contenant les événements de transformation empilés.

II.1.2. Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer la caractérisation moléculaire des PGM

Actuellement, la caractérisation moléculaire au niveau de l'ADN (*i.e.* hors études d'expression) est généralement réalisée à l'aide d'analyses de type « Southern blot » (Southern 1975) et de réactions en chaîne par polymérase (PCR) suivies de séquençage et d'analyses bioinformatiques. Or, les analyses de type « Southern blot » ne permettent pas d'établir de manière certaine qu'aucune intégration inattendue de petits fragments d'ADN exogène n'a eu lieu dans le génome de la PGM, en plus des inserts identifiés et caractérisés à l'aide de ces méthodes (Endo *et al.* 2015). Par ailleurs, elles présentent un certain nombre d'inconvénients : utilisation de quantités importantes d'ADN et de sondes radiomarquées, nombreuses manipulations manuelles successives, difficiles à standardiser, ce qui pose des problèmes de reproductibilité de la méthode, impossibilité d'automatiser du fait que le design expérimental est spécifique à chaque OGM, etc.

L'analyse de type « Southern blot » peut donc prendre beaucoup de temps et être relativement coûteuse sans fournir de détails au niveau de la séquence. Une application, appelée Southern-by-Sequencing (SbS), utilisant la capture de séquence couplée à la technologie de « séquençage de nouvelle génération » (NGS), a été développée par Zastrow-Hayes *et al.* (2015) pour permettre la sélection d'événements dans un environnement de caractérisation moléculaire à haut débit. Le SbS est obtenu en hybridant des banques d'ADN de génomes entiers indexées et regroupées, provenant de PGM, avec des sondes biotinylées conçues pour cibler, soit des éléments de l'ADN-T, soit des séquences du squelette du vecteur plasmidique. Ce processus enrichit les données en séquences des régions d'intérêt. En exploitant les données de séquence de l'ADN adjacent aux bases ciblées par les sondes, il est possible de détecter les jonctions plasmide/génome et plasmide/plasmide introduites lors de l'insertion de l'ADN-T dans le génome de la plante. L'analyse de ces séquences de jonction fournit les informations suivantes :

- nombre de locus d'insertion, y compris la détection de petits fragments d'ADN non liés et ségrégeant indépendamment ;
- nombre de copie(s) de l'ADN (des ADN) inséré(s) ;
- réarrangements, troncatures ou délétions dans l'ADN destiné à être inséré ;
- séquence de l'insert (des inserts) et des régions flanquantes en 5' et 3' de l'insert (des inserts) ;
- présence de séquences du squelette du vecteur plasmidique utilisé pour la transformation.

L'analyse SbS permet donc de réaliser la caractérisation moléculaire des PGM conformément à la réglementation en vigueur.

Plusieurs exemples d'utilisation des techniques de NGS pour la caractérisation moléculaire de PGM (maïs, papaye, riz et soja GM) sont décrits dans la littérature (Kovalic *et al.* 2012, Liang *et al.* 2014, Ming *et al.* 2008, Wahler *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013) ou dans des demandes d'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 récemment expertisées par l'Anses (exemples : dossiers n° EFSA-GMO-NL-2014-121, EFSA-GMO-NL-2015-124, EFSA-GMO-BE-

2015-125 et EFSA-GMO-NL-2017-140). Ils montrent que l'utilisation de NGS permet de recueillir toutes les informations requises concernant la caractérisation moléculaire de la PGM.

L'article de Yang *et al.* (2013) montre également que l'approche NGS permet de disposer d'informations plus précises et exhaustives que des analyses de type « Southern blot ». En effet, dans le cas d'un riz GM, l'analyse classique (Tang *et al.* 2006) avait conduit à une caractérisation incomplète de la PGM, liée à une mauvaise maîtrise technique du « Southern blot », qui n'avait été réalisé qu'avec une enzyme de restriction qui ne présentait pas de site de coupure dans le transgène. Les travaux ultérieurs de Yang *et al.* (2013) ont permis de corriger les omissions de la précédente caractérisation, en mettant en évidence deux sites d'insertion du transgène, alors que l'article de Tang *et al.* (2006) n'en décrivait qu'un seul. Dans ce même article, Yang *et al.* (2013) montrent que la caractérisation antérieure d'un autre riz GM (Tu *et al.* 2000, Wu *et al.* 2010), également fondée sur des analyses de type « Southern blot », présentait aussi des erreurs. En effet, deux inserts, l'un de 599 bp et le second de 9818 pb, ont été identifiés par séquençage complet, alors que seul l'insert de 9818 pb avait été décrit dans les travaux antérieurs. De plus, des erreurs significatives dans la description initiale de l'extrémité 5' du fragment de 9818 pb ont été mises en évidence dans l'étude par NGS.

Le Panel GMO de l'EFSA a publié en 2018 une note technique relative à la qualité du séquençage de l'ADN pour la caractérisation moléculaire des PGM (EFSA GMO Panel 2018).

Dans ce contexte, le GT « Biotechnologie » considère que les analyses de type « Southern blot » sont obsolètes et que la caractérisation moléculaire de la PGM devrait être réalisée à l'aide des techniques de « séquençage de nouvelle génération » (NGS), qu'il s'agisse d'une PGM à événement de transformation simple ou d'une PGM contenant des événements de transformation empilés. Cette analyse peut être réalisée par deux approches : soit un séquençage complet du génome, soit une analyse ciblée sur les zones d'intérêt. Le GT « Biotechnologie » souhaite que le pétitionnaire précise en particulier :

- la technique (exemple : PCR inverse) ou la technologie (exemples : Illumina, Ion Torrent, PacBio), la méthode de séquençage (lecture courte, lecture longue, etc.) et le design expérimental utilisés ;
- la profondeur du séquençage ;
- l'utilisation éventuelle d'un génome de référence ;
- les outils bioinformatiques utilisés pour réaliser les assemblages et/ou la recherche de variants ;
- la recherche de transcrits au niveau des séquences de jonction lorsque de nouvelles ORF sont créées.

II.2. Propositions portant sur l'évaluation comparative des PGM

II.2.1. Démarche actuelle pour l'évaluation comparative des PGM

Jusqu'au 18 avril 2004, date d'entrée en vigueur du règlement (CE) n° 1829/2003, les OGM et produits dérivés destinés à l'alimentation humaine relevaient du règlement (CE) n° 258/97, alors que les OGM destinés à l'alimentation animale étaient couverts par la directive 90/220/CEE, puis par la directive 2001/18/CE.

La directive 90/220/CEE comportait des éléments relatifs à la protection de la santé humaine et mentionnait l'évaluation de la toxicité et de l'allergénicité potentielles parmi les éléments devant figurer dans les demandes d'autorisation. Cependant, elle ne donnait pas d'indication précise sur

la manière de conduire cette évaluation. La directive 2001/18/CE n'a pas apporté d'élément supplémentaire, excepté la prise en compte de la santé animale en plus de la santé humaine.

De même, concernant l'évaluation de la sécurité sanitaire et l'évaluation nutritionnelle, le règlement (CE) n° 258/97 comportait des principes généraux¹⁰, qui ont été repris et étendus à la santé animale dans le règlement (CE) n° 1829/2003^{11 et 12}, mais ces deux règlements ne précisent pas la manière dont ces évaluations doivent être réalisées. En revanche, ils introduisent la notion de comparaison des aliments GM avec les aliments qu'ils sont destinés à remplacer.

Le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 fixe qu'avec la caractérisation moléculaire, l'analyse comparative de la composition et des caractéristiques agronomiques et phénotypiques doit constituer le point de départ permettant de structurer et d'exécuter l'évaluation des risques d'un nouvel aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM. Elle doit avoir pour objet l'inventaire des similarités et des différences :

- de composition, de qualité agronomique et de caractéristiques phénotypiques entre la PGM et son équivalent non transgénique ;
- de composition entre l'aliment GM et son équivalent non transgénique.

S'il n'est pas possible de déterminer d'équivalent non transgénique approprié (exemple : lorsque l'aliment GM n'est pas étroitement lié à une denrée alimentaire ou à un aliment pour animaux possédant un historique d'utilisation sûre), l'évaluation comparative de la sécurité ne peut pas être réalisée. Dans ce cas, l'évaluation de la sécurité et l'évaluation nutritionnelle de l'aliment GM doivent être menées conformément aux dispositions du règlement (CE) n° 258/97¹³ applicables aux nouveaux aliments n'ayant pas d'équivalent non transgénique.

Le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 précise aussi la manière dont les essais au champ, sur lesquels l'évaluation comparative est fondée, doivent être menés en termes de :

- choix de l'équivalent non transgénique et des autres comparateurs ;
- dispositif expérimental et analyse statistique des données ;
- sélection du matériel et des composés pour analyse.

Il comprend également des dispositions spécifiques pour l'analyse comparative de la composition, l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques et les effets de la transformation.

Concernant les PGM contenant des événements de transformation empilés, il n'est pas toujours possible d'utiliser un équivalent non transgénique au patrimoine génétique aussi proche de celui de la PGM que l'est celui de l'équivalent non transgénique utilisé d'ordinaire pour un événement de transformation simple. En pareil cas, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que le demandeur doit motiver dûment le choix de l'équivalent non transgénique et en évaluer les limites aux fins de l'évaluation des risques.

¹⁰ Les aliments ou ingrédients alimentaires qui relèvent du présent règlement ne doivent pas (i) présenter de danger pour le consommateur, (ii) induire le consommateur en erreur et (iii) différer des aliments et ingrédients alimentaires qu'ils sont destinés à remplacer à un point tel que leur consommation normale impliquerait des inconvénients nutritionnels pour le consommateur.

¹¹ Les denrées alimentaires visées à l'article 3, paragraphe 1, ne doivent pas (i) avoir des effets négatifs sur la santé humaine, la santé animale ou l'environnement, (ii) induire le consommateur en erreur et (iii) différer à un point tel des denrées alimentaires qu'elles sont destinées à remplacer que leur consommation normale serait, du point de vue nutritionnel, désavantageuse pour le consommateur.

¹² Les aliments pour animaux visés à l'article 15, paragraphe 1, ne doivent pas (i) avoir des effets négatifs sur la santé humaine, la santé animale ou l'environnement, (ii) induire l'utilisateur en erreur, (iii) nuire au consommateur ou l'induire en erreur par l'altération des caractéristiques spécifiques des produits d'origine animale et iv) différer à un point tel des aliments pour animaux qu'ils sont destinés à remplacer que leur consommation normale serait, du point de vue nutritionnel, désavantageuse pour les animaux ou les êtres humains.

¹³ Le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 a été abrogé et remplacé par le règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015.

Selon le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, les conclusions de l'analyse comparative doivent indiquer clairement :

- si les caractéristiques agronomiques et phénotypiques de la PGM diffèrent de celles de l'équivalent non transgénique et/ou sont équivalentes à celles des variétés de référence, à l'exception du (des) caractère(s) introduit(s) et compte tenu de la variation naturelle ;
- si les caractéristiques de la composition de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux GM diffèrent de celles de l'équivalent non transgénique et/ou sont équivalentes à celles des variétés de référence, compte tenu de la variation naturelle et à l'exception du (des) caractère(s) introduit(s) ;
- les caractéristiques de la PGM ou de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux GM qui requièrent un examen approfondi, du fait qu'elles diffèrent de celles de l'équivalent non transgénique et/ou ne sont pas équivalentes à celles des variétés de référence, compte tenu de la variation naturelle ;
- si, dans le cas d'événements de transformation empilés, il y a des indications d'interactions entre les événements de transformation.

II.2.2. Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer l'évaluation comparative des PGM

L'analyse de la composition est l'un des moyens de mesurer des effets résultant de la modification génétique, que ces effets soient ceux recherchés ou la conséquence de changements involontaires et non prévisibles (Cellini *et al.* 2004). Elle peut également contribuer à détecter, au sein d'une PGM contenant des événements de transformation empilés, les effets d'interactions entre ces événements sur le plan moléculaire, protéique ou métabolique.

Actuellement, la PGM est comparée avec un équivalent non transgénique (appelé témoin dans la suite du document), dont le fonds génétique est aussi proche que possible de celui de la PGM, et avec 6 variétés de référence au minimum, sur la base d'essais au champ menés sur au moins 8 sites expérimentaux. La PGM est comparée avec le témoin à l'aide de tests statistiques de différence et avec les variétés de référence à l'aide de tests d'équivalence (EFSA GMO Panel 2010e, 2011 ; Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013). La comparaison de la PGM avec le témoin est destinée à identifier les effets qui sont liés à la modification génétique « toutes choses étant égales par ailleurs » (le fonds génétique des 2 plantes étant quasiment identique et les 2 plantes étant cultivées sur les mêmes sites et dans les mêmes conditions). Les variétés de référence sont pour leur part utilisées pour estimer la variabilité naturelle des paramètres mesurés, afin de déterminer si les éventuelles différences observées entre la PGM et le témoin ont une signification biologique. Les composés analysés et les méthodes de mesure utilisées sont ceux des documents consensus de l'OCDE¹⁴.

Le GT « Biotechnologie » estime qu'il n'est pas possible, dans l'immédiat, de s'affranchir de l'utilisation des comparateurs (témoin et variétés de référence) sur chacun des sites d'essais, même si cela alourdit les dispositifs expérimentaux et augmente le coût des essais, car les effets de l'environnement et du fonds génétique dans lequel l'événement de transformation a été placé sont souvent très supérieurs à ceux liés à la modification génétique (Bernillon *et al.* 2018, Coll *et al.* 2011, Ricoch, Bergé, et Kuntz 2011, Ricoch 2013).

¹⁴ <http://www.oecd.org/chemicalsafety/biotrack/consensus-document-for-work-on-safety-novel-and-foods-feeds-plants.htm>

Par ailleurs, le GT « Biotechnologie » estime que dans certains cas, la sensibilité des méthodes des document consensus de l'OCDE devrait être améliorée et la liste des composés complétée, en tenant compte de l'évolution des connaissances concernant les composés antinutritionnels, toxiques ou allergènes naturellement présents dans les plantes. A titre d'exemple, la solanine ne figure pas dans le document consensus de l'OCDE relatif à la tomate (2008), alors que ce fruit en contient (Dolan, Matulka, et Burdock 2010). D'autre part, pour certaines espèces qui font l'objet du développement de PGM, il n'existe pas encore de document consensus de l'OCDE (exemples : aubergine, haricot, melon, pomme). Des compléments à ce niveau sont donc nécessaires.

Enfin, les approches « omiques » (transcriptomique, protéomique et métabolomique) sont souvent évoquées comme des moyens d'accéder à une connaissance plus complète des effets de la transformation génétique sur la composition de la PGM (Coll *et al.* 2011, Heinemann, Kurenbach, et Quist 2011, van Dijk *et al.* 2014, Wang *et al.* 2018). Toutefois, les résultats d'études utilisant ces techniques montrent que les effets de l'environnement et du fonds génétique sont souvent très supérieurs à ceux liés à la modification génétique (Bernillon *et al.* 2018, Coll *et al.* 2011, Ricroch, Bergé, et Kuntz 2011, Ricroch 2013). Ces techniques sont prometteuses, mais avant qu'elles ne puissent être utilisées en routine, un important travail de normalisation des méthodes et de développement d'outils informatiques et de tests statistiques (incluant l'analyse de puissance du dispositif) adaptés aux analyses « omiques » reste à réaliser (Cellini *et al.* 2004, Guitton *et al.* 2017, Lefort *et al.* 2018, McCarthy, Chen, et Smyth 2012, Polpitiya *et al.* 2008, Such-Sanmartin *et al.* 2014, Valdés *et al.* 2013).

II.3. Propositions portant sur l'évaluation de la toxicité potentielle des PGM

II.3.1. Démarche actuelle pour l'évaluation de la toxicité potentielle des PGM

L'historique des évolutions réglementaires concernant l'évaluation de la toxicité potentielle des OGM est le même que celui de l'évaluation comparative (Cf. II.2.) jusqu'à l'entrée en vigueur du règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, dans lequel cette évaluation repose principalement sur l'analyse de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) et sur l'étude de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM entier. Selon ce règlement, l'évaluation toxicologique doit avoir pour objectifs :

- de démontrer que l'effet (les effets) recherché(s) de la modification génétique n'a (n'ont) pas d'effet néfaste sur la santé humaine ou animale ;
- de démontrer que l'effet (les effets) non recherché(s) de la (des) modification(s) génétique(s) détecté(s) ou dont l'apparition est présumée n'a (n'ont) pas d'effet néfaste sur la santé humaine ou animale ;
- de déceler les effets néfastes éventuels des nouveaux constituants et de déterminer la dose sans effets néfastes la plus élevée ;
- de déceler les effets néfastes éventuels pour l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM entier ou de dissiper les incertitudes restantes grâce à la réalisation d'études par administration orale à des animaux pendant 90 jours.

Ainsi, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que :

- le demandeur doit juger de la nature des études toxicologiques à mener sur les nouveaux constituants et l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM entier sur la base des résultats des analyses moléculaire et comparative. Il doit également évaluer les résultats des études toxicologiques effectuées afin de juger de la nécessité de soumettre les nouveaux constituants ou l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM entier à des études

complémentaires (études sur des animaux relatives à la toxicité pour la reproduction ou pour le développement, par exemple) ;

- le demandeur doit tenir compte de la présence de protéines nouvellement exprimées, de la présence éventuelle d'autres nouveaux constituants et/ou d'éventuels changements de la teneur en constituants naturels au-delà de la variation normale ;

- si la demande a pour objet des denrées alimentaires et aliments pour animaux GM produits à partir de PGM, le demandeur est tenu de fournir des études toxicologiques sur les produits transformés, sauf s'il fournit une évaluation des risques présentés par la PGM (ou des parties pertinentes de celle-ci) qui en atteste l'innocuité et si rien n'indique l'existence de différences entre la denrée alimentaire ou l'aliment pour animaux GM transformés et leur équivalent non transgénique. Le demandeur doit fournir une justification adéquate à ce sujet ;

- les études toxicologiques ayant pour objet d'évaluer les risques pour la santé humaine et/ou animale doivent se compléter mutuellement. La plupart des études requises pour l'évaluation de la sécurité de denrées alimentaires GM sont également valables pour l'évaluation de la sécurité d'aliments pour animaux GM ;

- le demandeur doit recourir à des protocoles et méthodes de recherche de toxicité internationaux. Il doit motiver toute adaptation de ces protocoles ou tout recours à une méthode qui ne relève pas desdits protocoles ;

- le demandeur doit fournir une évaluation pour toute protéine nouvellement exprimée. Les études requises doivent être choisies au cas par cas, en fonction de l'état des connaissances scientifiques sur la source, la fonction ou l'activité de la protéine et des antécédents de consommation par l'Homme ou les animaux. S'agissant des protéines exprimées dans les PGM, les études de toxicité spécifiques ne sont pas requises lorsque l'utilisation sûre à des fins de consommation sous la forme de denrées alimentaires et/ou d'aliments pour animaux est dûment établie, tant pour la plante que pour les protéines nouvellement exprimées. Dans ce cas, le demandeur doit fournir les informations utiles relatives aux antécédents d'utilisation sûre des protéines ;

- lorsque des études spécifiques sont requises, la protéine considérée doit être équivalente à la protéine nouvellement exprimée telle qu'elle est exprimée dans la PGM. En cas de recours à une protéine produite par des micro-organismes, faute de matériels d'essai issus de la plante en quantité suffisante, il y a lieu de démontrer l'équivalence entre ce substitut microbien et la protéine nouvellement exprimée dans la plante sur les plans structural, biochimique et fonctionnel. Lorsque la protéine exprimée dans la plante et son substitut microbien présentent des différences, il convient d'évaluer en quoi ces différences sont significatives pour les études relatives à la sécurité.

Selon le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, pour établir l'innocuité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s), le demandeur doit fournir :

- une caractérisation moléculaire et biochimique de cette (ces) protéine(s), des études des modifications post-traductionnelles et une description de la fonction de cette (ces) protéine(s). Pour les enzymes nouvellement exprimées, il doit également fournir des informations sur l'activité enzymatique, la spécificité du substrat et les éventuels produits de réaction. Il doit par ailleurs évaluer les interactions éventuelles avec d'autres constituants de la plante ;

- une recherche actualisée d'homologie avec des protéines dont on sait qu'elles ont des effets néfastes, telles que les protéines toxiques. Une recherche de l'homologie avec des protéines exerçant une fonction métabolique ou structurale normale peut également apporter des informations intéressantes. La (les) base(s) de données et la méthode utilisées pour mener la recherche en question doivent être précisées ;

- une description de la stabilité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) dans des conditions de transformation et de stockage pertinentes, ainsi que du traitement dont les denrées alimentaires et aliments pour animaux feront l'objet. L'influence des variations de température et de pH doit être examinée, et toute modification potentielle des protéines ou

production de fragments protéiniques stables découlant desdits traitements doivent être caractérisées ;

- des données relatives à la résistance de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) aux enzymes protéolytiques, obtenues notamment par des études *in vitro* menées au moyen de tests appropriés et normalisés. Les produits de dégradation stables doivent être caractérisés et évalués au regard des effets néfastes sur la santé que leur activité biologique est susceptible de provoquer ;
- une étude de toxicité par administration orale répétée (vingt-huit jours) de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) à des rongeurs. Au besoin, en fonction du résultat de cette étude, d'autres examens plus ciblés doivent être prévus, dont une analyse d'immunotoxicité ;
- des études d'administration combinée de protéines lorsque la modification génétique entraîne l'expression d'au moins deux protéines dans la PGM et lorsqu'il est constaté, dans l'état actuel des connaissances scientifiques, que des interactions (synergies ou antagonismes) pourraient poser des problèmes de sécurité.

En revanche, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 précise que l'évaluation de la toxicité aiguë de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) ne fait pas partie des études à réaliser.

Pour l'évaluation des denrées alimentaires et aliments pour animaux contenant des PGM à événement de transformation simple ou des PGM à événements empilés non obtenues par croisement classique de PGM à événement simple, consistant en de telles plantes, ou produits à partir de celles-ci, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 indique que le demandeur doit prévoir une étude par administration orale de l'aliment entier à des rongeurs pendant 90 jours. Pour les événements de transformation empilés obtenus par croisement classique de PGM contenant un ou plusieurs événements de transformation, chacune des PGM à événement de transformation simple parentales doit faire l'objet d'une telle étude. Une étude de ce type doit également être réalisée pour les PGM à événements de transformation empilés lorsque l'évaluation de la stabilité des inserts, de l'expression de ceux-ci et des effets (synergies ou antagonismes) potentiels découlant de la combinaison des événements de transformation indique la possibilité d'effets néfastes.

Il est indiqué dans le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 que :

- les modalités de l'étude de la toxicité des denrées alimentaires et aliments pour animaux GM doivent être conformes à celles de « l'essai de toxicité subchronique par voie orale - toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours » du tableau 1 de ce règlement et respecter un protocole adapté ;
- il y a lieu d'utiliser, en principe, au moins deux doses d'essai et un échantillon de contrôle négatif. La dose la plus élevée doit être la dose maximale qu'il est possible d'atteindre sans entraîner de déséquilibre nutritionnel. La dose la plus faible doit toujours contenir une quantité de la denrée alimentaire et/ou de l'aliment pour animaux supérieure à l'apport attendu chez l'Homme ou l'animal cible ;
- l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) GM analysé doit être en rapport avec le produit destiné à être consommé ;
- dans le cas de PGM tolérantes à un herbicide, le matériel d'essai doit provenir de la PGM exposée à l'herbicide d'intérêt ;
- dans la mesure du possible, les informations sur la variation naturelle des paramètres d'essai doivent être déduites des données sur les antécédents d'utilisation sûre plutôt que de l'inclusion, dans les expérimentations, d'aliments (denrées alimentaires et aliments pour animaux) disponibles dans le commerce et issus de plantes non génétiquement modifiées possédant un historique d'utilisation sûre ;
- l'analyse statistique doit viser avant tout à la détection de toute différence entre le matériel d'essai et son échantillon de contrôle. Il y a lieu de recourir à une analyse de la puissance afin d'estimer la taille d'échantillon qui permettra de détecter une ampleur des effets

biologiquement pertinente précisée au préalable avec un seuil de puissance et de signification donné.

II.3.2. Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer l'évaluation de la toxicité potentielle des PGM

L'étude de la PGM ou de produits issus de la PGM par administration orale pendant 90 jours chez les rongeurs est la seule étude à visée toxicologique réalisée sur l'aliment en tant que tel. De même que l'étude d'alimentarité, elle est intégrative, puisqu'elle prend en compte la PGM dans son ensemble, au-delà de la présence des protéines nouvellement exprimées. Elle apparaît comme une étude sentinelle pertinente pour détecter des effets involontaires et non prévisibles qui pourraient résulter de la modification génétique et qui n'auraient pas été mis en évidence par la caractérisation moléculaire et l'évaluation comparative.

Concernant les événements de transformation empilés obtenus par croisement classique de PGM contenant un ou plusieurs événements de transformation, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que :

- chacune des PGM à événement de transformation simple parentales doit faire l'objet d'une telle étude ;
- une étude de ce type doit également être réalisée pour les PGM à événements de transformation empilés lorsque l'évaluation de la stabilité des inserts, de l'expression de ceux-ci et des effets (synergies ou antagonismes) potentiels découlant de la combinaison des événements de transformation indique la possibilité d'effets néfastes.

Enfin, des analyses du transcriptome et du métabolome ont été mises en œuvre sur le foie, le rein, le sang et l'urine dans les études de toxicité de 6 mois chez le rat réalisées dans le cadre du projet GMO90+ (Coumoul *et al.* 2018). Ces études n'ont pas mis en évidence d'effet des PGM administrées. Cependant, le GT « Biotechnologie » estime que l'utilisation des approches « omiques » pourrait être pertinente pour l'évaluation toxicologique des PGM.

Pour certaines des premières PGM autorisées, aucune étude de toxicité sub-chronique de 90 jours n'est disponible, car cette étude n'était pas requise au moment où elles ont fait l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché. C'est pourquoi le GT « Biotechnologie » estime qu'une exception peut être admise pour ces PGM parentales (Cf. Partie I, étape 1). Par ailleurs, dans la mesure où l'étude des interactions entre protéines et de leurs effets à l'échelle d'un organisme entier n'en est qu'au stade de la recherche (Johnsson 2014), le GT « Biotechnologie » a défini une méthode d'évaluation pas à pas des PGM contenant des événements de transformation empilés (Cf. Partie I, étapes 2 et 3). Cette démarche répond à la double nécessité de mettre en place une analyse cohérente des dossiers, actuellement construits sur la base d'argumentaires hétérogènes faute d'exigences spécifiques avant l'entrée en vigueur du règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, et de définir les principaux sujets de préoccupation toxicologique concernant ces PGM.

Le GT « Biotechnologie » souhaite également développer une méthode qui permettrait d'analyser conjointement plusieurs paramètres, tels que l'ensemble des paramètres rénaux ou hépatiques. En effet, à l'heure actuelle, chaque paramètre mesuré dans l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours est analysé séparément des autres et dans ces conditions, il n'est pas toujours évident de déterminer la signification biologique d'effets observés sur quelques paramètres. Le travail porterait sur la définition des groupes de paramètres à analyser conjointement et des tailles d'effet, et il s'appuierait sur les outils statistiques disponibles (analyses multivariées (PLS, ACP, MANOVA, etc.)). Par ailleurs, pour les variables mesurées longitudinalement (comme le poids par exemple), le GT « Biotechnologie » souhaite que dorénavant, les pétitionnaires utilisent un modèle mixte approprié (Anses, 2011).

II.4. Propositions portant sur l'évaluation de l'allergénicité potentielle des PGM

II.4.1. Démarche actuelle pour l'évaluation de l'allergénicité potentielle des PGM

Jusqu'à l'entrée en vigueur du règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, l'historique des évolutions réglementaires concernant l'évaluation de l'allergénicité potentielle des OGM est le même que celui de l'évaluation comparative (Cf. II.2.). Le document guide du Panel GMO de l'EFSA (2006) a été le premier à consacrer un paragraphe spécifique à l'évaluation de l'allergénicité potentielle des PGM et de leurs produits dérivés. De nouvelles recommandations, plus complètes, ont été publiées en 2010 (EFSA GMO Panel 2010d). Elles ont été reprises dans le document guide du Panel GMO de l'EFSA (2011), puis dans le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013. De nouvelles recommandations ont été publiées en 2017 (EFSA GMO Panel 2017). Parallèlement, l'EFSA a lancé un appel d'offres visant le développement de protocoles et la production de données expérimentales qui permettraient d'améliorer les tests de dégradation *in vitro* des protéines actuellement utilisés pour caractériser la résistance de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) à la protéolyse digestive.

L'évaluation de l'allergénicité potentielle est donc le domaine de l'évaluation de la sécurité sanitaire des OGM qui a subi (et subit encore) le plus d'évolutions. Actuellement, elle repose sur l'évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) et des propriétés d'adjuvant de cette (ces) protéine(s) d'une part, et sur l'évaluation de l'allergénicité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux GM d'autre part (règlement d'exécution (UE) n° 503/2013).

Concernant l'évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s), le demandeur doit :

- vérifier si la source du (des) transgène(s) est allergénique ;
- rechercher d'éventuelles identités de séquences, globales ou locales, entre la (les) protéine(s) nouvellement exprimée(s) et des allergènes connus ;
- analyser la résistance de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) à la protéolyse digestive. Cette analyse est actuellement réalisée à l'aide de tests *in vitro*, que l'appel d'offres de l'EFSA (Cf. supra) vise à améliorer.

Le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit également que le demandeur doit procéder à un dépistage sérique spécifique dans les cas suivants :

- la (les) source(s) du (des) gène(s) introduit(s) est (sont) connue(s) pour être allergénique(s), même si aucune homologie de séquence entre la (les) protéine(s) nouvellement exprimée(s) et un (des) allergène(s) connu(s) n'a été démontrée ;
- la source n'est pas réputée allergénique, mais il y a des indications qu'il existerait un lien (homologie de séquence ou similarité structurale) entre la (les) protéine(s) nouvellement exprimée(s) et un (des) allergène(s) connu(s).

Toutefois, la mise en œuvre de ce dépistage n'est pas toujours possible, car il nécessite des sérums de patients allergiques qu'il n'est pas toujours facile de se procurer et d'utiliser. En effet, les règles drastiques d'étiquetage des sérums humains exigent de préserver l'anonymat des patients allergiques, ce qui est une procédure assez lourde à mettre en œuvre. De plus, le consentement éclairé des patients est nécessaire pour pouvoir utiliser leurs sérums à d'autres fins que le diagnostic. Par ailleurs, les sérums de patients allergiques peuvent avoir des réactivités très différentes selon les individus. Ils posent donc un problème de standardisation, qui n'a pas encore été résolu. Enfin, la rareté de certaines allergies alimentaires rend difficile le recours à des dosages immunochimiques faisant appel aux immunoglobulines E (IgE), car ces IgE sont disponibles dans les sérums de quelques personnes seulement.

En ce qui concerne l'analyse des propriétés d'adjuvant de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s), le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 précise que lorsque des aspects fonctionnels connus de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) ou une similarité structurale à des adjuvants connus peuvent être le signe d'une éventuelle activité adjuvante, le demandeur doit évaluer l'éventuel rôle de cette (ces) protéine(s) en tant qu'adjuvant(s).

Enfin, si l'allergénicité de la plante réceptrice est avérée (allergénicité naturelle connue du soja, par exemple), le demandeur doit évaluer tout changement potentiel de l'allergénicité de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux GM par comparaison de son répertoire d'allergènes avec celui de l'équivalent non transgénique. Les analyses doivent en particulier porter sur l'éventuelle surexpression de l'allergène (des allergènes) endogène(s) naturel(s) dans la PGM. Le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 précise que le demandeur doit déterminer la marche à suivre au cas par cas, en fonction des informations disponibles concernant le potentiel allergénique de la plante réceptrice. Il prévoit qu'en règle générale, les analyses sont réalisées à l'aide de méthodes analytiques, telles que la protéomique, combinées à l'utilisation de sondes constituées de sérums humains. Toutefois, pour les mêmes raisons que celles évoquées ci-dessus concernant la disponibilité limitée de tels sérums, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 permet aussi l'utilisation de sérums d'animaux sensibilisés en laboratoire dans des conditions bien définies.

Concernant les PGM contenant des événements de transformation empilés, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 indique simplement que le demandeur doit, au cas par cas, fournir une évaluation de tout potentiel d'allergénicité accrue pour les êtres humains et les animaux.

II.4.2. Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer l'évaluation de l'allergénicité potentielle des PGM

Le GT « Biotechnologie » est en accord avec la méthodologie actuellement utilisée pour évaluer l'allergénicité potentielle de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s). En revanche, le problème de l'évaluation des propriétés d'adjuvant de cette (ces) protéine(s) reste entier, dans la mesure où les directives actuelles (recherche d'identités de séquence avec des toxines connues) demeurent insuffisantes. Le cas des protéines Cry, dont l'éventuel caractère adjuvant fait l'objet d'une controverse depuis plusieurs années, en est une illustration.

Les protéines Cry ne présentent pas d'identités de séquences avec des toxines connues. En revanche, différentes publications rapportent une immunogénicité importante (IgG) de la protoxine chez le cobaye et le rat (Prasad et Shethna 1975) et le caractère adjuvant de la protoxine Cry1Ac chez la souris (Esquivel-Pérez et Moreno-Fierros 2005, Vázquez *et al.* 1999, Vázquez-Padrón *et al.* 1999). Dans ces travaux, les propriétés adjuvantes se manifestent par voie intragastrique ou intrapéritonéale et elles dépendent de la nature et de la quantité des antigènes co-administrés à l'animal. Toujours chez la souris, les effets adjuvants de la protéine Cry1Ac entraînent une protection accrue des animaux vis-à-vis de différents parasites (Carrasco-Yepey *et al.* 2010, Legorreta-Herrera, Oviedo Meza, et Moreno-Fierros 2010).

Toutefois, une étude critique des résultats présentés dans ces publications (Joshi *et al.* 2016) conclut qu'en raison de leur niveau d'expression très faible dans les PGM, il est peu probable que les protéines Cry issues de la consommation de PGM ou de leurs produits dérivés puissent fonctionner comme des adjuvants. Par ailleurs, une recherche de l'activité immunogène, allergénique ou adjuvante de la toxine Cry1Ab chez la souris, après administration intragastrique de 10 µg de cette protéine associée ou non à un allergène du lupin, s'est avérée négative (Andreassen *et al.* 2016). Dans une publication récente, réalisée sur un modèle ovalbumine-souris (Santos-Vigil *et al.* 2018), l'administration hebdomadaire de 50 µg de Cry1Ac par voie intra-

gastrique durant 7 semaines induit une réponse immunologique, notamment IgE, et a un effet adjuvant de l'allergie à l'ovalbumine plus faible que celle induite par la toxine cholérique. Ces résultats restent difficilement transposables à l'Homme.

Ces exemples de résultats contradictoires issus d'études menées selon des protocoles différents illustrent la nécessité de disposer d'une méthodologie harmonisée pour évaluer les propriétés d'adjuvant des protéines nouvellement exprimées dans les PGM.

Concernant l'évaluation d'un éventuel changement de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés lié à la modification génétique, qui doit être réalisée lorsque l'allergénicité de la plante réceptrice est avérée, la réglementation prévoit une comparaison du répertoire d'allergènes de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux GM avec celui de l'équivalent non transgénique (règlement d'exécution (UE) n° 503/2013). Le document guide du Panel GMO de l'EFSA (2010d) présente une revue détaillée des méthodes utilisables, ainsi que leurs nombreuses limites, dont la disponibilité limitée des sérums humains (Cf. supra). Face à cette difficulté et dans la mesure où le répertoire complet des allergènes d'une espèce végétale n'est pas connu, une alternative consiste à mesurer les teneurs de protéines allergéniques majeures (Graf, Hayder, et Mueller 2014). Une méthode de spectrométrie de masse utilisant des étalons internes marqués a par exemple été développée pour quantifier les allergènes majeurs du soja (Houston *et al.* 2011).

Le GT « Biotechnologie » considère qu'à terme, l'analyse des allergènes pourrait faire partie de l'évaluation comparative des PGM, lorsque des approches « omiques » seront disponibles pour une utilisation en routine (Cf. II.2.2.). Dans l'intervalle, les connaissances sur l'allergénicité des protéines du soja, du maïs, du colza, de la pomme de terre et du cotonnier, ainsi que sur les propriétés classiquement associées à l'allergénicité (résistance à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive) permettent de proposer une liste d'allergènes qui pourraient être utilisés comme marqueurs d'une modification de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés liée à la modification génétique.

Pour établir cette liste, le GT « Biotechnologie » a étudié les allergènes connus du soja, du maïs, de la pomme de terre, du colza et du cotonnier. Certains de ces allergènes sont des protéines appartenant à la famille des « pathogenesis-related proteins » (PR-protéines), qui sont synthétisées par la plante en réponse à des attaques de pathogènes. Dans la mesure où la synthèse de ces protéines dépend fortement des conditions environnementales, elles ne constituent pas de bons candidats. Cependant, les protéines de transfert des lipides (LTP) demeurent intéressantes du fait de leur très bonne résistance à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive. Les autres allergènes de la graine correspondent principalement à des protéines de stockage et à des inhibiteurs tryptiques. Leur synthèse étant moins influencée par les conditions environnementales, ils constituent de bons candidats. De plus, leur degré de conservation modéré leur confère une bonne spécificité. D'autres allergènes ubiquitaires (panallergènes) doivent être évités, du fait de leur forte sensibilité à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive et/ou du fait de leur degré élevé de conservation. Enfin, la N-glycosylation des allergènes est un autre facteur à prendre en compte, car les glycanes sont susceptibles d'être reconnus comme des glycotopes, qui pourraient introduire des divergences dans la capacité des allergènes à se lier aux IgE.

Les allergènes suivants ont été retenus pour une analyse détaillée :

- Gly m 1 (1HYP), Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4 (2K7H), Gly m 5 (1IPJ), Gly m 6 (1FXZ), Gly m 7, Gly m 8 et SBA (2SBA) pour le soja ;
- Zea m 1 (2HCZ), Zea m 12, Zea m 14 (1AFH), Zea m 15 et zéamatine (1DU5) pour le maïs ;
- Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3 et Sola t 4 pour la pomme de terre ;
- Bra n 1 (1SM7) et cruciférine (3KGL) pour le colza ;

- Gos H 5 (1A0K) et Gos h vicilin pour le cotonnier.

L'étude a porté sur :

- la structure tridimensionnelle de ces protéines, disponible dans la « RCSB Protein Data Bank »¹⁵ (Rose *et al.* 2015) ou construite à l'aide du logiciel YASARA Structure¹⁶ (Krieger, Koraimann, et Vriend 2002) ;
- les régions conservées à la surface de ces allergènes, identifiées à l'aide du « ConSurf server »¹⁷ (Ashkenazy *et al.* 2010, Ashkenazy *et al.* 2016, Celniker *et al.* 2013) ;
- les données relatives à l'allergénicité et à la résistance à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive *in vitro* de ces allergènes, collectées dans la littérature ;
- les sites de coupure par la pepsine, prédits à pH 1,3 et 2,5 à l'aide du logiciel PeptideCutter¹⁸ (Gasteiger *et al.* 2005).

Les résultats de cette étude montrent que les allergènes suivants pourraient être utilisés comme marqueurs d'une modification de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés liée à la modification génétique :

- pour le soja : les protéines de réserve de la graine telles que Gly m 5 (viciline), Gly m 6 (légumine) et Gly m 8 (albumine 2S), ainsi que la lectine (SBA) ;
- pour le maïs : des protéines particulièrement résistantes à la dénaturation thermique et à la protéolyse digestive, telles que Zea m 14 (LTP) et la zéamatine (protéine « thaumatin-like » (TLP)) ;
- pour le colza : des protéines de réserve de la graine, telles que Bra n 1 (albumine 2S) et la cruciférine ;
- pour la pomme de terre : des inhibiteurs trypsiques particulièrement abondants dans le tubercule, tels que Sola t 1 (inhibiteur de cathepsine), Sola t 2 (inhibiteur protéasique à cystéine) et Sola t 3 (inhibiteur protéasique à sérine) ;
- pour le cotonnier : une viciline (« Gos h Vicilin »).

Le GT « Biotechnologie » propose que la concentration de ces allergènes soit mesurée dans les PGM et comparée aux concentrations mesurées dans les plantes témoins.

II.5. Propositions portant sur l'évaluation nutritionnelle des PGM

II.5.1. Démarche actuelle pour l'évaluation nutritionnelle des PGM

Jusqu'à l'entrée en vigueur du règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, l'historique des évolutions réglementaires concernant l'évaluation nutritionnelle des OGM est le même que celui de l'évaluation comparative (Cf. II.2.).

Le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 reprend en partie les recommandations du groupe de travail constitué par le Panel GMO de l'EFSA pour définir le rôle des essais d'alimentation animale dans l'évaluation de la sécurité et l'évaluation nutritionnelle des PGM et de leurs produits dérivés (EFSA GMO Panel 2008). Il précise que le demandeur doit fournir une évaluation nutritionnelle permettant de démontrer que :

- l'introduction sur le marché des denrées alimentaires ou aliments pour animaux GM concernés n'est pas, d'un point de vue nutritionnel, désavantageuse pour les êtres humains ou les animaux. Cette évaluation doit porter notamment sur l'intérêt nutritionnel des protéines nouvellement exprimées, des autres nouveaux constituants et des changements des teneurs

¹⁵ <https://www.rcsb.org/>

¹⁶ <http://www.yasara.org/products.htm>

¹⁷ <http://consurf.tau.ac.il/2016/>

¹⁸ https://web.expasy.org/peptide_cutter/

en constituants des denrées alimentaires ou aliments pour animaux, ainsi que sur les éventuelles altérations du régime alimentaire global du consommateur ou de l'animal ;
- les effets non recherchés de la modification génétique, décelés ou dont les analyses moléculaires, phénotypiques ou de composition antérieures permettent de présumer qu'ils se sont produits, n'ont pas d'influence négative sur la valeur nutritionnelle des denrées alimentaires ou aliments pour animaux GM.

Pour les événements de transformation empilés, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 prévoit que le demandeur doit fournir une évaluation des changements potentiels de la valeur nutritionnelle susceptibles d'être dus à des effets (synergies ou antagonismes) résultant de la combinaison des événements de transformation, dont les changements de la composition.

Selon ce règlement, l'évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires et aliments pour animaux GM doit tenir compte :

- des teneurs en nutriments et en facteurs antinutritionnels dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux GM ;
- de la biodisponibilité et de l'efficacité biologique des nutriments présents dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux, compte tenu de l'incidence éventuelle du transport, du stockage et du traitement de la denrée alimentaire et de l'aliment pour animaux ;
- de la consommation attendue de l'aliment concerné, et des conséquences nutritionnelles de celle-ci.

Ce règlement prévoit également que lorsque l'analyse comparative révèle des caractéristiques de composition des denrées alimentaires ou aliments pour animaux GM différentes de celles de leur équivalent non transgénique ou non équivalentes aux caractéristiques des variétés de référence, la pertinence de ces caractéristiques sur le plan nutritionnel doit être évaluée sur la base de l'état des connaissances scientifiques. Si cette évaluation permet de conclure à l'équivalence sur le plan nutritionnel, aucune étude supplémentaire ne doit être réalisée. En revanche, si elle ne permet pas de conclure à l'équivalence, des études nutritionnelles doivent être réalisées. Des études de croissance comparative doivent être menées sur des animaux juvéniles à croissance rapide (tels que des poussins de poulet de chair en tant qu'animaux types pour les non-ruminants, des agneaux pour les ruminants ou d'autres animaux à croissance rapide).

Enfin, le règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 comporte des dispositions spécifiques pour les études nutritionnelles des denrées alimentaires GM d'une part et pour les études nutritionnelles des aliments pour animaux GM d'autre part.

II.5.2. Propositions du GT « Biotechnologie » pour améliorer l'évaluation nutritionnelle des PGM

L'évaluation nutritionnelle des PGM est le plus souvent réalisée par des études d'alimentarité réalisées sur des poulets à croissance rapide. Ces études reposent sur l'analyse des effets de la PGM, après incorporation dans un aliment complet, sur les performances de croissance des animaux, leur mortalité en élevage et leur rendement en carcasse et en viande après abattage. Cette étude se rapproche de l'utilisation réelle de la PGM, puisqu'elle est menée sur un grand nombre d'animaux nourris pendant 42 jours avec des aliments contenant la PGM. De plus, au même titre que l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours, l'étude d'alimentarité est intéressante parce qu'elle est intégrative, puisqu'elle prend en compte la PGM dans son ensemble et contribue par conséquent à détecter des effets involontaires et non prévisibles qui pourraient résulter de la modification génétique.

Le GT « Biotechnologie » estime que l'étude d'alimentarité pourrait être enrichie d'investigations complémentaires, dans le même esprit que celles décrites dans la ligne directrice VICH GL43 (2008) pour les produits pharmaceutiques à usage vétérinaire. La démarche proposée est la suivante :

- prélèvements de sang et de tissus conservés dans des fixateurs ;
- autopsies systématiques réalisées obligatoirement par un vétérinaire anatomopathologiste.

En cas d'observations douteuses lors des autopsies, des analyses histologiques (signes de stéatose hépatique, d'altérations rénales ou d'altérations musculaires, par exemple) seraient réalisées sur les tissus prélevés et les échantillons de sang feraient l'objet d'une analyse hématobiochimique complète. Ce type d'étude (tolérance sur espèce cible) se pratique en routine dans les sociétés de recherche sous contrat (CRO), dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL). De plus, cette démarche permettrait de se rapprocher des recommandations du Comité scientifique de l'EFSA en matière de remplacement, de réduction et d'optimisation des tests sur les animaux (EFSA Scientific Committee 2009).

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Les principales propositions d'amélioration de l'évaluation de la sécurité sanitaire des PGM sont les suivantes :

- Caractérisation moléculaire : abandonner les analyses de type « Southern blot » au profit des techniques de « séquençage de nouvelle génération » (NGS).
- Evaluation comparative : contribuer aux travaux de l'OCDE concernant la mise à jour des documents consensus existants (liste des composés analysés et méthodes de mesure) et le développement de documents consensus pour les espèces qui font l'objet du développement de PGM et pour lesquelles il n'en existe pas encore.
- Evaluation de la toxicité potentielle : (i) améliorer les référentiels actuels (réglementation et documents guides de l'EFSA) concernant l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours, en donnant plus de détails sur la manière de la réaliser (à l'instar de ce qui a été fait pour les essais au champ) et sur la marche à suivre dans le cas des PGM à événements de transformation empilés, (ii) développer un outil permettant de tester des groupes de paramètres reliés à différentes fonctions (rénale, hépatique, etc.), plutôt que de tester chaque paramètre indépendamment, comme c'est le cas aujourd'hui et (iii) demander que les pétitionnaires utilisent un modèle mixte approprié pour les variables mesurées longitudinalement (Anses, 2011).
- Evaluation de l'allergénicité potentielle : (i) contribuer à développer une méthodologie harmonisée pour évaluer les propriétés d'adjuvant des protéines nouvellement exprimées dans les PGM et (ii) développer des outils permettant de quantifier les allergènes proposés comme marqueurs d'une modification de l'allergénicité de la PGM ou de ses produits dérivés liée à la modification génétique.
- Evaluation nutritionnelle : pousser davantage les investigations dans les études d'alimentarité sur poulet, en réalisant des prélèvements de sang et de tissus, ainsi que des autopsies systématiques dont les résultats détermineront la réalisation ou non d'analyses histologiques et hématobiochimiques sur les échantillons de sang et de tissus.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GT « Biotechnologie ».

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

OGM, plantes génétiquement modifiées contenant des événements de transformation empilés, évaluation des risques sanitaires

GMO, genetically modified plants containing stacked transformation events, health risk assessment

BIBLIOGRAPHIE

Publications

- Afssa. 2005. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 2 décembre 2005 relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié MIR 604 résistant à des insectes, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2006. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 22 juin 2006 relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié GA21 tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2008a. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 3 juin 2008 relatif à la demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché d'un maïs génétiquement modifié Bt11, résistant à des lépidoptères et tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'importation, la transformation de grains ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2008b. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 15 mai 2008 relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié Bt11 x GA21, résistant aux lépidoptères et tolérant au glufosinate d'ammonium et au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2008c. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 10 juin 2008 relatif à une demande de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié

Bt11xMIR604, résistant aux insectes (lépidoptères et chrysomèles des racines) et tolérant au glufosinate d'ammonium, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

- Afssa. 2008d. Avis du 8 juillet 2008 relatif à une demande de mise sur le marché d'un maïs hybride génétiquement modifié MIR604xGA21, résistant aux chrysomèles des racines et tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2008e. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 14 novembre 2008 relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché de maïs hybride génétiquement modifié Bt11xMIR604xGA21, résistant à des insectes (lépidoptères et chrysomèles des racines) et tolérant aux herbicides glufosinate ammonium et glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de ses grains et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2009a. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 22 octobre 2009 relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché du maïs hybride génétiquement modifié Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21, résistant à des insectes et tolérant à des herbicides, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Afssa. 2009b. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 22 octobre 2009 relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché du maïs hybride génétiquement modifié Bt11 x MIR162 x GA21, résistant à des insectes et tolérant à des herbicides, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de leurs produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Andreassen, M., T. Bøhn, O.-G. Wikmark, J. Bodin, T. Traavik, M. Løvik, et U.C. Nygaard. 2016. "Investigations of immunogenic, allergenic and adjuvant properties of Cry1Ab protein after intragastric exposure in a food allergy model in mice." *BMC Immunology* 17(10): 12 pp.
- Anses. 2010. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 17 novembre 2010 relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché des maïs génétiquement modifiés MIR162, développés pour être résistant à des insectes, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.
- Anses. 2011. Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Avis de l'Anses, rapport d'expertise collective, 95 pages.
- Anses. 2016. Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail du 18 février 2016 relatif à l'évaluation conduite par le Panel GMO de l'EFSA sur la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 (dossier n° EFSA-GMO-DE-2009-66).
- Ashkenazy, H., S. Abadi, E. Martz, O. Chay, I. Mayrose, T. Pupko, et N. Ben-Tal. 2016. "ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules." *Nucleic Acids Research* 44 (Web Server issue): W344-W350.

- Ashkenazy, H., E. Erez, E. Martz, T. Pupko, et N. Ben-Tal. 2010. "ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids." *Nucleic Acids Research* 38 (Web Server issue): W529-W533.
- Bernillon, S., M. Maucourt, C. Deborde, S. Chéreau, D. Jacob, N. Priymenko, B. Laporte, X. Coumoul, B. Salles, P.M. Rogowsky, F. Richard-Forget, et A. Moing. 2018. "Characterization of GMO or glyphosate effects on the composition of maize grain and maize-based diet for rat feeding." *Metabolomics* 14(36): 12 pp.
- Carrasco-Yepe, M., S. Rojas-Hernandez, M.A. Rodriguez-Monroy, L.I. Terrazas, et L. Moreno-Fierros. 2010. "Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response." *Parasite Immunology* 32(9-10): 505-511.
- Cellini, F., A. Chesson, I. Colquhoun, A. Constable, H.V. Davies, K.H. Engel, A.M.R. Gatehouse, S. Kärenlampi, E.J. Kok, J.-J. Leguay, S. Lehesranta, H.P.J.M. Noteborn, J. Pedersen, et M. Smith. 2004. "Unintended effects and their detection in genetically modified crops." *Food and Chemical Toxicology* 42(7): 1089-1125.
- Celniker, G., G. Nimrod, H. Ashkenazy, F. Glaser, E. Martz, I. Mayrose, T. Pupko, et N. Ben-Tal. 2013. "ConSurf: using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function." *Israel Journal of Chemistry* 53(3-4): 199-206.
- Coll, A., A. Nadal, M. Rossignol, P. Puigdomènech, et M. Pla. 2011. "Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields." *Transgenic Research* 20(4): 939-949.
- Coumoul, X., R. Servien, L. Juricek, Y. Kaddouch-Amar, Y. Lippi, L. Berthelot, C. Naylies, M.-L. Morvan, J.-P. Antignac, C. Desdoits-Lethimonier, B. Jegou, M. Tremblay-Franco, C. Canlet, L. Debrauwer, C. Le Gall, J. Laurent, P.-A. Gouraud, J.-P. Cravedi, E. Jeunesse, N. Savy, K. Dandere-Abdoulkarim, N. Arnich, F. Fourès, J. Cotton, S. Broudin, B. Corman, A. Moing, B. Laporte, F. Richard-Forget, R. Barouki, P. Rogowsky, et B. Salles. 2018. "The GMO90+ project: absence of evidence for biologically meaningful effects of genetically modified maize-based diets on Wistar rats after 6-months feeding comparative trial." *Toxicological Sciences* Sous presse.
- Dolan, L.C., R.A. Matulka, et G.A. Burdock. 2010. "Naturally occurring food toxins." *Toxins* 2(9): 2289-2332.
- EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." *EFSA Journal* 99: 1-100.
- EFSA GMO Panel. 2007. "Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on applications (references EFSA-GMO-UK-2005-19 and EFSA-GMO-RX-GA21) for the placing on the market of glyphosate-tolerant genetically modified maize GA21, for food and feed uses, import and processing and for renewal of the authorisation of maize GA21 as existing product, both under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds S.A.S. on behalf of Syngenta Crop Protection AG." *EFSA Journal* 5(10): 541, 25 pp.
- EFSA GMO Panel. 2008. "Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials." *Food and Chemical Toxicology* 46: S2-S70.
- EFSA GMO Panel. 2009a. "Application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-11) for the placing on the market of insect-resistant genetically modified maize MIR604 event, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds S.A.S. on behalf of Syngenta Crop Protection AG. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms." *EFSA Journal* 7(7): 1193, 26 pp.

- EFSA GMO Panel. 2009b. "Opinion on application reference EFSA-GMO-RX-Bt11 for renewal of the authorisation of existing products produced from insect-resistant genetically modified maize Bt11, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta." *EFSA Journal* 7(2): 977, 13 pp.
- EFSA GMO Panel. 2009c. "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2007-49) for the placing on the market of the insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize Bt11 x GA21 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds." *EFSA Journal* 7(9): 1319, 27 pp.
- EFSA GMO Panel. 2010a. "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2007-48) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MIR604 x GA21 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds." *EFSA Journal* 8(5): 1611, 30 pp.
- EFSA GMO Panel. 2010b. "Scientific Opinion on application (Reference EFSA-GMO-UK-2007-50) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize Bt11 x MIR604, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds." *EFSA Journal* 8(5): 1614, 30 pp.
- EFSA GMO Panel. 2010c. "Scientific Opinion on application (Reference EFSA-GMO-UK-2008-56) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize Bt11 x MIR604 x GA21, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds." *EFSA Journal* 8(5): 1616, 30 pp.
- EFSA GMO Panel. 2010d. "Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed." *EFSA Journal* 8(7): 1700, 168 pp.
- EFSA GMO Panel. 2010e. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs." *EFSA Journal* 8(1): 1250, 59 pp.
- EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." *EFSA Journal* 9(5): 2150, 37 pp.
- EFSA GMO Panel. 2012. "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-DE-2010-82) for the placing on the market of insect-resistant genetically modified maize MIR162 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta." *EFSA Journal* 10(6): 2756, 27 pp.
- EFSA GMO Panel. 2017. "Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants." *EFSA Journal* 15(6): 4862, 49 pp.
- EFSA GMO Panel. 2018. "Technical note on the quality of DNA sequencing for the molecular characterisation of genetically modified plants." *EFSA Journal* 16(7): 5345, 11 pp.
- EFSA Scientific Committee. 2009. "Existing approaches incorporating replacement, reduction and refinement of animal testing: applicability in food and feed risk assessment." *EFSA Journal* 7(6): 1052, 77 pp.
- Endo, M., M. Kumagai, R. Motoyama, H. Sasaki-Yamagata, S. Mori-Hosokawa, M. Hamada, H. Kanamori, Y. Nagamura, Y. Katayose, T. Itoh, et S. Toki. 2015. "Whole-genome analysis of herbicide-tolerant mutant rice generated by *Agrobacterium*-mediated gene targeting." *Plant and Cell Physiology* 56(1): 116-125.
- Esquivel-Pérez, R., et L. Moreno-Fierros. 2005. "Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered." *Viral Immunology* 18(4): 695-708.
- Food Safety Commission of Japan. 2016. "Soybean lines generated through cross-breeding of MON87705, MON87708 and MON89788." *Food Safety* 4(4): 169-172.

- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, et A. Bairoch. 2005. "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." Dans *The Proteomics Protocols Handbook*, édité par J.M. Walker, 571-607. Totowa, NJ: Humana Press.
- Graf, L., H. Hayder, et U. Mueller. 2014. "Endogenous allergens in the regulatory assessment of genetically engineered crops." *Food and Chemical Toxicology* 73: 17-20.
- Guitton, Y., M. Tremblay-Franco, G. Le Corguillé, J.-F. Martin, M. Pétéra, P. Roger-Mele, A. Delabrière, S. Goulitquer, M. Monsoor, C. Duperier, C. Canlet, R. Servien, P. Tardivel, C. Caron, F. Giacomoni, et E.A. Thévenot. 2017. "Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 93: 89-101.
- Heinemann, J.A., B. Kurenbach, et D. Quist. 2011. "Molecular profiling - a tool for addressing emerging gaps in the comparative risk assessment of GMOs." *Environment International* 37(7): 1285-1293.
- Houston, N.L., D.-G. Lee, S.E. Stevenson, G.S. Ladics, G.A. Bannon, S. McClain, L. Privalle, N. Stagg, C. Herouet-Guicheney, S.C. MacIntosh, et J.J. Thelen. 2011. "Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry." *Journal of Proteome Research* 10(2): 763-773.
- Johnsson, N. 2014. "Analyzing protein-protein interactions in the post-interactomic era. Are we ready for the endgame?" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445(4): 739-745.
- Joshi, S.S., B. Barnett, N.G. Doerrer, K. Glenn, R.A. Herman, C. Herouet-Guicheney, P. Hunst, J. Kough, G.S. Ladics, S. McClain, S. Papineni, L.K. Poulsen, J.-B. Rasclé, A.-L. Tao, R. van Ree, J. Ward, et C.C. Bowman. 2016. "Assessment of potential adjuvanticity of Cry proteins." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 79: 149-155.
- Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett, et G. Bannon. 2012. "The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology." *The Plant Genome* 5(3): 149-163.
- Krieger, E., G. Koraimann, et G. Vriend. 2002. "Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47(3): 393-402.
- Lefort, G., L. Liaubet, C. Canlet, P. Tardivel, M.-C. Pere, H. Quesnel, A. Paris, N. Iannuccelli, N. Vialaneix, et R. Servien. 2018. "ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D ¹H NMR spectra." *bioRxiv*: 407924.
- Legorreta-Herrera, M., R. Oviedo Meza, et L. Moreno-Fierros. 2010. "Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of *Plasmodium*-infected CBA/Ca mice." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 11 pp.
- Liang, C., J.P. van Dijk, I.M.J. Scholtens, M. Staats, T.W. Prins, M.M. Voorhuijzen, A.M. da Silva, A.C.M. Arisi, J.T. den Dunnen, et E.J. Kok. 2014. "Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing *vip3A* by real-time PCR and next-generation sequencing." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(11): 2603-2611.
- McCarthy, D.J., Y. Chen, et G.K. Smyth. 2012. "Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation." *Nucleic Acids Research* 40(10): 4288-4297.

- Ming, R., S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J.H. Saw, P. Senin, W. Wang, B.V. Ly, K.L.T. Lewis, S.L. Salzberg, L. Feng, M.R. Jones, R.L. Skelton, J.E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R.E. Paull, T.P. Michael, K. Wall, D.W. Rice, H. Albert, M.-L. Wang, Y.J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R.A. Acob, P. Guan, A. Blas, C.M. Wai, C.M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J.-K. Na, E.V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J.E. Bowers, A.R. Gschwend, A.L. Delcher, R. Singh, J.Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Perez, M.J. Torres, F.A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A.M. Burroughs, M.-C. Luo, L. Liu, D.A. Christopher, S.M. Mount, P.H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M.A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D.E. Shippen, C.W. dePamphilis, J.D. Palmer, M. Freeling, A.H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, et M. Alam. 2008. "The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus)." *Nature* 452(7190): 991-996.
- Polpitiya, A.D., W.-J. Qian, N. Jaitly, V.A. Petyuk, J.N. Adkins, D.G. 2nd Camp, G.A. Anderson, et R.D. Smith. 2008. "DAnTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data." *Bioinformatics* 24(13): 1556-1558.
- Prasad, S.S.S.V., et Y.I. Shethna. 1975. "Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 62(3): 517-523.
- Ricroch, A.E. 2013. "Assessment of GE food safety using '-omics' techniques and long-term animal feeding studies." *New Biotechnology* 30(4): 349-354.
- Ricroch, A.E., J.B. Bergé, et M. Kuntz. 2011. "Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques." *Plant Physiology* 155(4): 1752-1761.
- Rose, P.W., A. Pričić, C. Bi, W.F. Bluhm, C.H. Christie, S. Dutta, R. Kramer Green, D.S. Goodsell, J.D. Westbrook, J. Woo, J. Young, C. Zardecki, H.M. Berman, P.E. Bourne, et S.K. Burley. 2015. "The RCSB Protein Data Bank: views of structural biology for basic and applied research and education." *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue): D345-D356.
- Santos-Vigil, K.I., D. Ilhuicatzí-Alvarado, A.L. García-Hernández, J.S. Herrera-García, et L. Moreno-Fierros. 2018. "Study of the allergenic potential of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy." *International Immunopharmacology* 61: 185-196.
- Southern, E.M. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *Journal of Molecular Biology* 98(3): 503-517.
- Steiner, H.-Y., C. Halpin, J.M. Jez, J. Kough, W. Parrott, L. Underhill, N. Weber, et L.C. Hannah. 2013. "Editor's Choice: Evaluating the potential for adverse interactions within genetically engineered breeding stacks." *Plant Physiology* 161(4): 1587-1594.
- Such-Sanmartin, G., S. Sidoli, E. Ventura-Espejo, et O.N. Jensen. 2014. "KYSS: mass spectrometry data quality assessment for protein analysis and large-scale proteomics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445(4): 702-707.
- Tang, W., H. Chen, C. Xu, X. Li, Y. Lin, et Q. Zhang. 2006. "Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene." *Molecular Breeding* 18(1): 1-10.
- Tu, J., G. Zhang, K. Datta, C. Xu, Y. He, Q. Zhang, G.S. Khush, et S.K. Datta. 2000. "Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin." *Nature Biotechnology* 18(10): 1101-1104.
- Valdés, A., C. Simó, C. Ibáñez, et V. García-Cañas. 2013. "Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods." *Trends in Analytical Chemistry* 52: 2-15.

- van Dijk, J.P., C.S. de Mello, M.M. Voorhuijzen, R.C.B. Hutten, A.C.M. Arisi, J.J. Jansen, L.M.C. Buydens, H. van der Voet, et E.J. Kok. 2014. "Safety assessment of plant varieties using transcriptomics profiling and a one-class classifier." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70(1): 297-303.
- Vázquez-Padrón, R.I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G.A. de la Riva, et R. López-Revilla. 1999. "Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice." *Life Sciences* 64(21): 1897-1912.
- Vázquez, R.I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G.A. De La Riva, et R. López-Revilla. 1999. "*Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant." *Scandinavian Journal of Immunology* 49(6): 578-584.
- Wahler, D., L. Schausser, J. Bendiek, et L. Grohmann. 2013. "Next-generation sequencing as a tool for detailed molecular characterisation of genomic insertions and flanking regions in genetically modified plants: a pilot study using a rice event unauthorised in the EU." *Food Analytical Methods* 6(6): 1718-1727.
- Wang, X.-J., X. Zhang, J.-T. Yang, et Z.-X. Wang. 2018. "Effect on transcriptome and metabolome of stacked transgenic maize containing insecticidal *cry* and glyphosate tolerance *epsps* genes." *Plant Journal* 93(6): 1007-1016.
- Wu, G., Y. Wu, S. Nie, L. Zhang, L. Xiao, Y. Cao, et C. Lu. 2010. "Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1." *Food Chemistry* 119(1): 417-422.
- Yang, L., C. Wang, A. Holst-Jensen, D. Morisset, Y. Lin, et D. Zhang. 2013. "Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches." *Scientific Reports* 3: 2839.
- Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddelloh, G.D. May, et M.K. Beatty. 2015. "Southern-by-Sequencing: a robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops." *The Plant Genome* 8(1): 1-15.

Législation, réglementation et documents normatifs

- Directive 90/220/CEE du Conseil du 23 avril 1990 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement. JO L 117 du 8.5.1990, pp. 15-27.
- 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. JO L 106 du 17.4.2001, pp. 1-38.
- Directive 2009/41/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (refonte). JO L 125 du 21.5.2009, pp. 75-97.
- European Medicines Agency, Veterinary Medicines and Inspections. 2008. VICH Topic GL43. "Guideline on Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products." EMEA/CVMP/VICH/393388/2006. Londres (Grande-Bretagne).
- NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).
- OCDE. 2008. "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Tomato: Key Food and Feed Nutrients, Toxicants and Allergens." Series on the Safety of

Novel Foods and Feeds No. 17. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Plus en vigueur (date de fin de validité : 31/12/2017, abrogé par 32015R2283). JO L 43 du 14.2.1997, pp. 1-6.

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 (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 (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 1852/2001 de la Commission. JO L 327 du 11.12.2015, pp. 1-22.

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.

ANNEXE 1 : ABBREVIATIONS ET DEFINITIONS

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADN-T : ADN de transfert
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférence
CEPRB : Centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques
CJUE : Cour de justice de l'Union européenne
CNUED : Conférence des Nations unies sur l'environnement et le développement
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (*European food safety authority*)
FP7 : septième programme-cadre de recherche (*seventh framework programme of the European Community for research and technological development including demonstration activities*)
GM : génétiquement modifié
GRACE : GMO Risk Assessment and Communication of Evidence
GT : groupe de travail
HCB : Haut Conseil des biotechnologies
Indel : insertion ou délétion dans une séquence d'ADN
kb : kilobase
LTP : protéines de transfert des lipides
NBT : nouvelles techniques de modification du génome (*new breeding techniques*)
NGS : séquençage de nouvelle génération (*next generation sequencing*)
OGM : organisme génétiquement modifié
ORF : cadre ouvert de lecture (*open reading frame*)
PCR : réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
PGM : plante génétiquement modifiée
SbS : Southern-by-Sequencing
SNP : mutation ponctuelle (*single nucleotide polymorphism*)
TFUE : traité sur le fonctionnement de l'Union européenne
US EPA : US Environmental Protection Agency
VTH : variétés tolérantes aux herbicides non transgéniques

Définitions

Évènement de transformation : combinaison unique d'une séquence d'ADN contenant un ou plusieurs transgène(s), dans un organisme donné, à un endroit donné du génome.

PGM à évènement de transformation simple : PGM contenant un seul évènement de transformation.

PGM contenant des évènements de transformation empilés : PGM contenant plusieurs évènements de transformation, obtenue par croisement(s) conventionnel(s) de PGM à évènement de transformation simple.

Sous-combinaisons d'évènements de transformation : lorsqu'une PGM contient n évènements de transformation empilés, les sous-combinaisons correspondent aux PGM contenant un nombre de ces évènements de transformation compris entre 2 et n-1.

Transgène : gène ajouté au patrimoine génétique d'un être vivant par génie génétique.

Vecteur : molécule d'ADN capable de s'autorépliquer, dans laquelle un ADN étranger est introduit par génie génétique et que l'on utilise pour faire pénétrer cet ADN dans une cellule hôte.



ANNEXE 2 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

PREAMBULE : les experts, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GRUPE DE TRAVAIL « BIOTECHNOLOGIE »

Président

M. Joël GUILLEMAIN (2012 - 2018) - Retraité - Domaine de compétence : toxicologie

M. Florian GUILLOU (2018 - 2021) - Directeur de recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Domaines de compétence : biochimie, métabolisme, physiologie animale, transgène animale, biologie moléculaire, composition chimique des plantes

Membres

M. Fabien ALLEMAN (2012 - 2021) - Enseignant-chercheur à l'Institut Polytechnique UniLaSalle - Domaines de compétence : composition des aliments, nutrition animale et zootechnie des volailles

Mme Elisabeth BAÉZA (2012 - 2021) - Ingénieur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : biochimie, composition des aliments, nutrition animale et zootechnie des volailles

M. Rémy CACHON (2012 - 2021) - Professeur à AgroSup Dijon - Domaines de compétence : génie enzymatique et microbiologique, procédés biotechnologiques, technologies alimentaires, produits fermentés

Mme Martine CLAUW (2015 - 2021) - Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) - Domaines de compétence : toxicologie, mycotoxines

M. Florentin CONSTANCIAS (2018 - 2021) - Chercheur au Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) - Domaines de compétence : écologie microbienne, bioinformatique, techniques omiques

M. Alain DESCHAMPS (2012 - 2015) - Professeur à l'Institut des Sciences et Techniques des aliments (ISTAB), Université Bordeaux 1 - Domaines de compétence : bactéries lactiques et fermentation, antagonismes microbiens, technologie alimentaire, enzymologie, microbiote

M. Jacques DIETRICH (2012 - 2018) - Directeur de la station de Sète de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) - Domaines de compétence : biologie moléculaire, enzymologie, biochimie, microbiologie, procédés technologiques

Mme Mylène DURAND-TARDIF (2012 - 2018) - Directeur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : plantes modèles, statistiques, génomique végétale, génétique des plantes, stress chez les plantes

M. Luc FERRARI (2018 - 2021) - Professeur à l'Université de Lorraine, Faculté de pharmacie - Domaines de compétence : toxicologie, génotoxicité

M. Luc FILLAUDEAU (2018 - 2021) - Directeur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : procédés alimentaires et biotechnologiques, transferts couplés

Mme Pascale GADONNA-WIDEHEM (2015 - 2018) - Enseignant-chercheur à l'Institut Polytechnique UniLaSalle - Domaines de compétence : microbiologie, procédés alimentaires

M. Michel GAUTIER (2012 - 2021) - Professeur à Agrocampus Ouest - Domaines de compétence : microbiologie, écologie microbienne, bactériophages, biologie moléculaire et génie génétique, hygiène des aliments, procédés technologiques

M. Florian GUILLOU (2012 - 2018) - Directeur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : biochimie, métabolisme, physiologie animale, transgénèse animale, biologie moléculaire, composition chimique des plantes

M. Thomas HAERTLÉ (2012 - 2018) - Directeur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : biochimie des protéines, enzymologie, biotechnologies, produits laitiers

Mme Nolwenn HYMERY (2015 - 2021) - Maître de conférences à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) - Domaines de compétence : toxicologie alimentaire, mycotoxines

M. Alban JACQUES (2015 - 2021) - Enseignant-chercheur à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, École d'Ingénieurs de Purpan (INP EI PURPAN) - Domaines de compétence : biologie moléculaire, physiologie végétale, transgénèse

Mme Lise JOUANIN (2012 - 2015) - Directeur de recherche émérite au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) - Domaines de compétence : physiologie végétale, biologie moléculaire, génétique et transgénèse végétales

Mme Martine KAMMERER (2012 - 2015) - Professeur à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes-Atlantique (Oniris) - Domaines de compétence : toxicologie animale

Mme Gisèle KANNY (2018 - 2021) - Professeur à Université de Lorraine, Faculté de médecine - Domaine de compétence : allergologie

M. Bernard KLONJKOWSKI (2012 - 2021) - Chercheur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) - Domaines de compétence : virologie, biologie moléculaire, transgénèse animale

M. Thomas LALOË (2018 - 2021) - Maître de conférences à l'Université de Nice-Sophia Antipolis - Domaine de compétence : statistiques

M. Thierry LEGAVRE (2012 - 2018) - Chercheur au CIRAD - Domaines de compétence : biologie moléculaire, plantes génétiquement modifiées, plantes tropicales, transgénèse végétale

M. Michel LESSIRE (2012 - 2021) - Ingénieur de recherche à l'INRA - Domaines de compétence : composition des aliments, nutrition animale et zootechnie des volailles

M. Rémi MAXIMILIEN (2012 - 2018) - Conseiller scientifique au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) - Domaine de compétence : médecin toxicologue

M. Didier MONTET (2012 - 2018) - Chercheur au CIRAD - Domaines de compétence : hygiène des aliments, microbiologie, enzymologie, traçabilité, fermentation

Mme Agnès PIQUET-PISSALOUX (2018 - 2021) - Professeur à VetAgro Sup - Domaines de compétence : physiologie végétale, agronomie, pratiques culturales

Mme Fabienne REMIZE-BARNAVON (2012 - 2015) - Professeur à l'Université de La Réunion - Domaines de compétence : biologie moléculaire, fermentations, enzymologie, hygiène des aliments, enzymes alimentaires

Mme Marie-Anne ROBIN (2012 - 2015) - Directeur de recherche à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) - Domaines de compétence : toxicologie, métabolisme

M. Pierre ROUGÉ (2012 - 2021) - Professeur émérite à l'Université Paul Sabatier, Faculté de pharmacie de Toulouse - Domaines de compétence : biologie végétale, biochimie, allergies alimentaires, biotechnologie

Mme Béatrice SÉGURENS (2015 - 2021) - Chercheur au CEA - Domaines de compétence : biologie moléculaire, génomique, NGS, métagénomique (microbiote humain)

M. Rémi SERVIEN (2015 - 2021) - Chargé de recherche à l'INRA - Domaine de compétence : biostatistiques

Mme Patricia TAILLANDIER (2018 - 2021) - Professeur à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques (INP ENSIACET) - Domaines de compétence : biochimie, fermentation, procédés technologiques

Mme Corinne TEYSSIER (2018 - 2021) - Maître de Conférences à l'Université de Montpellier - Domaines de compétence : microbiologie, écologie microbienne alimentaire, hygiène alimentaire

M. Hervé VANDERSCHUREN (2015 - 2021) - Professeur à l'Université de Liège - Domaines de compétence : biologie moléculaire, transgénèse végétale

Mme Laurence VERNIS (2015 - 2021) - Chargée de recherche à l'Inserm - Domaines de compétence : biologie moléculaire, microbiologie et physiologie des micro-organismes

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Emmanuelle PIC - Coordinatrice d'expertise scientifique - Anses

Contribution scientifique

Mme Emmanuelle PIC - Coordinatrice d'expertise scientifique - Anses

Mme Nathalie ARNICH - Adjointe au chef de l'unité « Évaluation des risques liés aux aliments » - Anses

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT - Anses

ANNEXE 3 : REFLEXION DU GT « BIOTECHNOLOGIE » CONCERNANT L'ÉVALUATION DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTÉINES NOUVELLEMENT EXPRIMÉES ET LES CONSTITUANTS DE LA PLANTE

En raison de la grande diversité des molécules constituant une plante, il est actuellement très difficile d'identifier les interactions entre celles-ci et les protéines nouvellement exprimées dans les PGM. L'évaluation comparative de la composition de la PGM et les tests d'alimentarité sont des moyens indirects d'évaluer ces interactions. Il est relativement plus facile d'identifier les interactions entre les protéines nouvellement exprimées dans les PGM contenant des événements de transformation empilés et d'en évaluer les impacts sur la sécurité sanitaire de ces PGM, en raison du nombre plus réduit de molécules concernées. Les éléments de réflexion du GT « Biotechnologie » sur ces deux aspects sont présentés ci-dessous.

La production de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s) dans la PGM peut avoir des effets inattendus. En effet, la surproduction, l'extinction ou l'activation d'une protéine peut induire des effets synergiques, additifs ou antagonistes (Steiner *et al.* 2013). L'analyse de ces effets est d'autant plus complexe que les protéines exercent rarement leurs fonctions de façon isolée. Elles peuvent agir au sein de complexes multi protéiques spécifiques, qui interviennent de façon déterminante dans la formation de structures macromoléculaires, la signalisation, la régulation et les différentes voies métaboliques. Ces interactions dépendent de nombreux facteurs (nature des protéines exprimées, interactions électrostatiques, hydrophobie, concentration, compartimentation, etc.).

Il est prévisible que l'évaluation des interactions entre les protéines nouvellement exprimées va se complexifier avec l'augmentation du nombre de PGM parentales utilisées pour produire des PGM contenant des événements de transformation empilés (Cf. 1.2.). Cependant, cette complexité est somme toute relative au regard de celle liée à l'étude des interactions entre ces protéines et l'ensemble des constituants de la plante. Par exemple, l'expression ou la surproduction de nombreuses protéines exogènes dans une PGM pourrait conduire à la perturbation d'interactomes protéiques natifs. Elle pourrait aussi provoquer un appauvrissement des quantités d'aminocyl-ARNt disponibles pour la traduction, ce qui pourrait conduire à une réduction de la production de certaines protéines contenant des acides aminés limitants (Lys, Cys, Trp). Elle pourrait également aboutir au titrage de certains cofacteurs (ions ou tout groupement prosthétique en quantité limitante).

Une des principales difficultés pour étudier ces interactions est la connaissance partielle du contenu protéique des plantes. S'il est désormais possible de séquencer aisément tout le génome d'un organisme et d'obtenir par analyse bioinformatique toutes les séquences codantes putatives, relier celles-ci à des fonctions protéiques est beaucoup plus difficile. Ainsi, le séquençage des génomes du blé (*Triticum aestivum*, 17.000 Mb), du maïs (*Zea mays*, 2.500 Mb), de l'Homme (*Homo sapiens*, 3.000 Mb), d'*Arabidopsis thaliana* (157 Mb) ou du riz (*Oryza sativa*, 430 Mb) n'a pas encore abouti à l'annotation fonctionnelle de chaque gène, notamment du fait de la complexité des génomes et de la polyploïdie de certains d'entre eux.

Il est par conséquent difficile, sur la simple base des observations effectuées sur les PGM à événement de transformation simple, de répondre aux questions posées par Steiner *et al.* (2013) concernant les PGM contenant des événements de transformation empilés :

- certaines des protéines nouvellement exprimées peuvent-elles agir comme activateurs ou inhibiteurs dans des cycles métaboliques influencés par les autres protéines nouvellement exprimées ?
- les éventuelles interactions sont-elles simplement additives, sans aucune conséquence sanitaire, ou sont-elles différentes des interactions entre les protéines nouvellement exprimées prises individuellement ?

- les protéines nouvellement exprimées modifient-elles le métabolisme et/ou le protéome de la plante ?
- peut-on s'attendre à ce que les protéines nouvellement exprimées dotent les PGM contenant des événements de transformation empilés de propriétés biochimiques différentes de celles des PGM à événement de transformation simple ?

A l'heure actuelle, les interactions sont peu évaluées par les pétitionnaires, et quand elles le sont, c'est à partir d'une étude bibliographique qui ne reflète probablement pas la réalité biologique. En effet, ces études présentent en général une analyse qualitative des interactions potentielles entre les protéines nouvellement exprimées, en montrant qu'elles agissent sur des cibles ou des substrats spécifiques, ou encore sur des voies métaboliques différentes. Cet aspect est généralement traité de façon superficielle, sans recherche de liens entre ces interactions et la composition des plantes.

Afin de mieux évaluer les interactions, deux approches peuvent être envisagées, l'une reposant sur des analyses *in silico* et l'autre sur une approche expérimentale.

1) L'analyse *in silico* : une approche prédictive des interactions

Il existe de nombreux sites internet recensant les interactions protéine-protéine et permettant de poser les bases de cette approche prédictive (exemples : STRING (<http://string.embl.de/>), IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>), BIND (<http://metadatabase.org/wiki/BIND>), iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>), BioGRID (<http://thebiogrid.org/>) et DIP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752321>)). Cependant, pour évaluer au mieux les interactions protéine-protéine, plusieurs paramètres importants doivent être pris en compte, tels que la charge des protéines, leur niveau de glycosylation et leur localisation tissulaire et cellulaire :

- l'analyse *in silico* des caractéristiques physico-chimiques des protéines exprimées dans les PGM permet de prédire si ces protéines sont susceptibles de développer des interactions essentiellement hydrophiles (polaires) et hydrophobes (apolaires). Par exemple, les protéines acides pourraient interagir avec des protéines basiques présentes dans le même compartiment et inversement ;
- la glycosylation post-traductionnelle de certaines de ces protéines peut être un facteur d'interaction avec d'autres protéines de la PGM, comme des lectines ou des glucanases par exemple ;
- la localisation tissulaire et cellulaire des protéines nouvellement exprimées est une donnée importante, car outre son effet sur les charges des protéines, elle permet de préjuger d'une interaction possible de manière spécifique dans certains compartiments. En effet, les interactions électrostatiques dépendent étroitement des conditions locales de pH et peuvent varier considérablement, voire disparaître, en fonction du pH du milieu local. Par exemple, dans les compartiments cellulaires où règnent essentiellement des conditions acides (vacuoles, régions sous-membranaires, lysosomes, etc.), les charges électro-négatives des acides aspartique et glutamique sont neutralisées. Dès lors, les interactions électrostatiques sont supprimées et les interactions hydrophobes et de van der Waals prédominent. Les compartiments cellulaires à caractère basique, susceptibles de s'opposer aux charges électro-positives de l'arginine et de la lysine, sont moins nombreux et ont une durée de vie très limitée.

Ces prédictions *in silico* sont utiles dans la recherche *a priori* du type d'interactions auxquelles on peut s'attendre en fonction des protéines exprimées dans les PGM contenant des événements de transformation empilés. Elles peuvent être utilisées pour orienter le choix d'approches expérimentales destinées à identifier les interactions protéine-protéine. Elles se heurtent

cependant à un manque de connaissances sur la localisation subcellulaire des protéines, leur transport cellulaire et leurs cinétiques d'expression et de dégradation.

2) Méthodes expérimentales

En dehors des méthodes prédictives, il existe de nombreuses méthodes expérimentales d'étude des interactions entre les protéines : analyse structurale, analyse des interactions multiples en temps réel par les méthodes classiques de dialyse à l'équilibre, de centrifugation analytique ou de diffusion de la lumière aux petits angles, méthodes faisant appel à la résonance plasmonique de surface (BIAcore) ou analyse par interféromètre, technique du double hybride, etc. Ces analyses expérimentales, réalisées à partir de protéines purifiées ou d'extraits cellulaires, revêtent une grande complexité et nécessitent de maîtriser de nombreuses approches méthodologiques et d'avoir une connaissance *a priori* des protéines qui pourraient interagir. Dans l'état actuel des connaissances et des méthodes, le GT « Biotechnologie » considère qu'il n'est pas approprié de les imposer aux pétitionnaires.