

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 27 juillet 2016

AVIS

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

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées et aux aliments pour animaux génétiquement modifiés, du maïs génétiquement modifié VCO-01981-5 tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-DE-2016-130)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 3 mai 2016 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003 relatif aux denrées et aux aliments pour animaux génétiquement modifiés, du maïs génétiquement modifié VCO-01981-5 tolérant au glyphosate, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-DE-2016-130).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

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

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 16 juin et le 21 juillet 2016. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices du Panel GMO de l'EFSA (2006 et 2011) et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

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

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL

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

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le maïs est une culture des zones tempérées à tropicales. Les principaux pays producteurs sont les USA, la Chine, le Brésil, l'Argentine, l'Ukraine, l'Inde, le Mexique et le Canada, qui représentent plus de 75 % de la production mondiale. En 2014, cette production était de 1.021.616.583 tonnes (dont 61.334.089 tonnes pour une surface récoltée de 9.618.499 hectares dans l'Union européenne, FAOSTAT¹) et 30 % du maïs cultivé était génétiquement modifié (James, 2014).

Les plantes sont récoltées entières avant la maturité complète des grains pour produire du fourrage ou de l'ensilage destiné à l'alimentation animale, ou bien sous forme de grains mûrs utilisés en alimentation animale ou humaine. Le maïs est également utilisé pour la production de biocarburants, de biogaz ou de bioplastique. Il est pauvre en protéines et la teneur des grains en deux acides aminés indispensables, la lysine et le tryptophane, est faible.

Le maïs VCO-01981-5 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome la cassette d'expression du gène *epsps grg23 ace5*, dérivé d'un gène d'*Arthrobacter globiformis*. Ce gène code une 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS ACE5) qui confère à la plante la tolérance au glyphosate sur une large plage de température. Pour rappel, la protéine EPSPS présente de façon native dans le maïs ne confère pas la tolérance au glyphosate.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de ce maïs. Il ne concerne pas sa mise en culture.

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

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

La transformation génétique a été réalisée sur la lignée Hi-II.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été réalisée sur des embryons immatures avec la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* dépourvue de son pouvoir pathogène. Le vecteur pAG3541 utilisé pour la transformation porte la cassette d'expression du gène *epsps grg23 ace5* entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T. Une souche d'*E. coli* portant le plasmide auxiliaire pRK2013 a été utilisée pour obtenir, par conjugaison triparentale, la souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur pAG3541.

¹ <http://faostat3.fao.org/home/F>

Les embryons immatures ont été collectés après pollinisation, puis co-cultivés avec la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide pAG3541. Les cals transformés ont été sélectionnés sur des milieux de culture contenant du timentin (contre-sélection des agrobactéries) et du glyphosate (sélection des cellules végétales transformées). Ils ont été placés sur un milieu favorisant la différenciation et la production de plantes qui ont été transférées sur sol. Les plantes de la génération T0 ainsi obtenues ont été sélectionnées pour la tolérance au glyphosate et la présence du gène d'intérêt (*epsps grg23 ace5*). Elles ont ensuite été croisées avec la lignée conventionnelle B110 pour produire la génération F₁ (que le pétitionnaire nomme BC0B). Enfin, deux générations d'autofécondation (BC0BS1 et BC0BS2) ont été produites, ainsi que différentes générations obtenues par des croisements avec les lignées de maïs conventionnel B110, AAX1, AAX8, AAX9, AAX10 et CH02.

La cassette d'expression du gène *epsps grg23 ace5* insérée dans le maïs VCO-01981-5 comprend :

- le promoteur, la région 5' non traduite (UTR) et un intron du gène de l'ubiquitine-4 (*ScUbi4*) de la canne à sucre (*Saccharum officinarum* L.) ;
- une séquence d'adressage de la protéine au chloroplaste, issue du gène de l'acétylhydroxyacide synthase (*ahas*) du maïs (*Zea mays* L.) ;
- la séquence codante du gène *epsps grg23 ace5* ;
- le terminateur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV).

La protéine EPSPS ACE5 codée par le gène *epsps grg23 ace5* est une 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase qui est peu sensible au glyphosate et confère à la plante la tolérance à cet herbicide. Cette protéine de 413 acides aminés a été obtenue en recourant à l'ingénierie des protéines par évolution dirigée pour modifier 10 acides aminés par rapport à la protéine native d'*A. globiformis*, EPSPS GRG23, qui confère la tolérance au glyphosate. L'objectif était d'obtenir une EPSPS dont la plage des températures d'activité est semblable à celle de l'EPSPS native du maïs (37° C), tout en conservant la tolérance au glyphosate.

La demi-vie de la protéine EPSPS ACE5 à 37° C est supérieure à celle de la protéine EPSPS GRG23 et se rapproche de celle de la protéine native du maïs. L'objectif de départ a donc été atteint, puisque l'activité de la protéine EPSPS ACE5 reste proche de 100 % jusqu'à des températures de 37° C. En revanche, elle est proche de zéro après 30 min d'incubation à 65 °C et à 95° C.

La protéine EPSPS ACE5 présente une affinité de liaison pour le phosphoénolpyruvate (PEP) comparable à celle de la protéine EPSPS GRG23 et de l'EPSPS native du maïs. En revanche, elle ne se lie que faiblement au glyphosate, ce qui est également le cas de la protéine EPSPS GRG23, alors que l'EPSPS du maïs présente une plus forte affinité de liaison pour le glyphosate que pour le PEP. Seules, les deux premières protéines confèrent la tolérance au glyphosate.

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

L'analyse moléculaire du maïs VCO-01981-5 repose sur des analyses de type Southern blot et sur l'amplification par PCR et le séquençage de l'insert (3692 pb) et des régions flanquantes en 5' et 3' de l'insert (respectivement 2 kb et 1,7 kb). Cette analyse a été réalisée sur le maïs VCO-01981-5 de la génération BC1B, obtenue par croisement de la génération F₁ avec la lignée B110 (Cf. II.1.2.1.). Deux comparateurs ont été utilisés : le maïs conventionnel B110 et le produit d'une ségrégation négative de la même génération que BC1B. L'absence de séquences issues du plasmide pAG3541 utilisé pour la transformation a été vérifiée sur ces maïs ainsi que sur le maïs VCO-01981-5 de la génération BC0BS2 (Cf. II.1.2.1.), qui a été comparé avec la lignée B110. Même s'il aurait été préférable d'utiliser des maïs de même fonds génétique que le maïs VCO-01981-5 plutôt que la lignée B110 dans ces études, cela ne remet pas en cause leur validité.

Les résultats montrent :

- une insertion unique de l'ADN-T, située sur le chromosome 1² du maïs ;
- l'identité d'organisation et de séquence de l'ADN-T inséré dans le génome du maïs VCO-01981-5 avec celles de l'ADN-T présent dans le vecteur pAG3541, à l'exception de deux délétions dans les bordures droite et gauche de l'ADN-T (22 pb et 16 pb, respectivement). Ces délétions ne semblent pas affecter la fonctionnalité de la cassette d'expression du gène *epsps grg23 ace5* ;
- une délétion de 21 pb dans le génome de la plante au site d'insertion ;
- l'absence de séquences issues du vecteur plasmidique.

L'absence de séquences issues du plasmide auxiliaire pRK2013 (Cf. II.1.2.1.) devrait également être vérifiée, même si la présence de telles séquences est très peu probable.

Les analyses bio-informatiques ne mettent pas en évidence d'ORF putative, sur l'ADN-T et au niveau des jonctions entre l'ADN-T et l'ADN génomique de la plante, présentant des homologies avec des gènes codant une toxine ou un allergène connu. La seule exception est une identité globale fortuite entre la protéine EPSPS ACE5 et deux allergènes connus, qui n'a pas de signification biologique (Cf. II.1.5.1.). En revanche, ces analyses montrent que l'ADN-T est inséré entre le promoteur et le site d'initiation de la traduction d'une unité de transcription putative. Cette région code potentiellement une protéine présentant 54 % d'homologie avec l'Acanthoscurrine-2 du maïs, qui est un peptide antimicrobien. Le pétitionnaire considère qu'il est peu probable que l'unité de transcription putative soit fonctionnelle dans le maïs VCO-01981-5, suite à l'insertion de l'ADN-T. Il déclare qu'aucune modification de la transcription du gène natif de l'Acanthoscurrine-2, localisé sur le chromosome 8, n'est attendue et que l'événement VCO-01981-5 ne montre aucun phénotype de sensibilité aux maladies laissant présager une altération de l'expression de ce gène. Néanmoins, le pétitionnaire aurait pu s'assurer par RT-PCR de la présence ou non d'un transcrite correspondant à la séquence du gène de l'Acanthoscurrine like, pour lequel il existe des EST (Expressed Sequence Tags).

Les teneurs de la protéine EPSPS ACE5 dans différents tissus (feuilles, racines, pollen et grains) prélevés à différents stades de développement de la plante ont été mesurées à l'aide de tests ELISA. Les plantes ont été cultivées sur 3 sites en Europe en 2011, avec et sans traitement avec du glyphosate (T et NT, respectivement). Les échantillons sont issus de plantes de maïs VCO-01981-5 de la génération BC3A₁S4*CH02 et d'un comparateur de même fonds génétique (AAX1 x CH02), utilisé comme témoin négatif. Les résultats montrent que quel que soit le tissu et le stade de développement considéré, la teneur en protéine EPSPS ACE5 dans le maïs VCO-01981-5 NT est similaire à celle du maïs VCO-01981-5 T. Dans les grains au stade mature (R6), la concentration moyenne de protéine EPSPS ACE5 est de 2,03 (± 0,74) et 2,32 (± 0,74) ng/mg de matière sèche pour le maïs VCO-01981-5 NT et T, respectivement.

Une analyse de ségrégation a été réalisée sur la présence du caractère de tolérance au glyphosate et du gène *epsps grg23 ace5*. Elle a été menée sur cinq générations (BC0L à BC0M), obtenues par un croisement de la génération F₁ avec la lignée AAX8 suivi de croisements avec les lignées AAX9 et AAX10 (Cf. II.1.2.1.). Les résultats montrent que l'insertion est stable, unique et à hérédité mendélienne.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs génétiquement modifié VCO-01981-5 ne sont pas suffisants pour démontrer que la protéine EPSPS ACE5 peut effectivement être considérée comme les EPSPS ayant un historique

² La localisation sur le chromosome 1 a été déterminée en réalisant une analyse bioinformatique sur le génome du maïs B73 (Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence *et al.* (2004), <http://www.maizegdb.org/>).

d'utilisation sûre ou les EPSPS ayant fait l'objet d'évaluations favorables. Par ailleurs, l'absence de séquences issues du plasmide auxiliaire pRK2013 devrait être vérifiée, de même que l'absence de transcrite correspondant à l'unité de transcription putative en amont de laquelle l'ADN-T est inséré.

II.1.3. Evaluation comparative

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

Deux essais ont été menés, l'un en 2010 et le second en 2011. L'évaluation porte sur la génération BC3A₁S2*CH02 du maïs VCO-01981-5 dans l'essai de 2010 et sur la génération BC3A₁S4*CH02 dans l'essai de 2011. Dans chaque essai, le maïs VCO-01981-5 est comparé avec une variété témoin de même fonds génétique (AAX1 x CH02) et six variétés commerciales de référence non génétiquement modifiées.

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

Le maïs VCO-01981-5, la variété témoin et les six variétés commerciales de référence ont été cultivés sur sept sites. Pour l'analyse comparative de la composition, quatre sites étaient situés en Espagne, deux en République slovaque et un en République tchèque. Pour l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, quatre sites étaient situés en République slovaque, trois en République tchèque et un en Roumanie. Sur chaque site, le maïs VCO-01981-5 a été cultivé avec ou sans traitement avec du glyphosate (respectivement T et NT). Chaque modalité (variété génétiquement modifiée T et NT, variété témoin et variétés commerciales) a été répétée cinq fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés.

Les caractéristiques de ce plan d'expérience ne respectent pas les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011), dans la mesure où les essais ont été réalisés sur sept sites au lieu de huit. De plus, pour l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques, les sites étaient tous situés dans un espace géographique limité à des pays d'Europe de l'Est. La non prise en compte des sites ibériques n'est pas suffisamment justifiée.

Les résultats bruts sont fournis sous format électronique dans le dossier. Ils ont été analysés avec le logiciel mis à disposition par l'EFSA³, qui permet de réaliser les analyses statistiques conformément aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 et selon les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2010 et 2011). Le maïs VCO-01981-5 est comparé à la variété témoin par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. Les erreurs de type 1 retenues par le pétitionnaire ne sont pas précisées. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010 et 2011), en classant les variables en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

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

Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2002), à l'exception du sodium, du sélénium, de la vitamine C, de l'acide folique, du DIMBOA, du raffinose et du furfural. D'autres éléments ont été dosés (amidon, hémicellulose et de nombreux acides gras). Le pétitionnaire n'explique pas ces choix.

Cette étude est jugée incomplète du fait de l'absence de certains composés. Par ailleurs, il est difficile de connaître avec précision le nombre de composés qui ont été dosés mais retirés des analyses statistiques parce que les valeurs mesurées étaient inférieures à la limite de détection ou de quantification de la méthode de mesure, ou parce que les valeurs entre les différentes modalités (variété génétiquement modifiée T et NT, variété témoin et variétés commerciales) étaient trop faibles pour permettre une analyse statistique.

³ <http://www.efsa.europa.eu/fr/applications/gmo/tools>

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 80 composés (12 pour le fourrage et 68 pour les grains) sont utilisables pour les analyses statistiques.

Pour le fourrage, tous les composés sont classés en catégorie I ou II (équivalence et équivalence plus probable que la non-équivalence, respectivement). Pour le grain du maïs VCO-01981-5 NT, le tryptophane, l'arginine et la vitamine B6 sont classés dans le type 5 (pas de différence significative et équivalence moins probable que la non-équivalence) et le potassium dans le type 6 (différence significative et équivalence moins probable que la non-équivalence). Les teneurs moyennes de ces quatre composés sont respectivement supérieures de 13 %, 14 %, 23 % et 16 % dans le maïs VCO-01981-5 NT par rapport aux variétés commerciales de référence. Pour le grain du maïs VCO-01981-5 T, la glycine et la vitamine B6 sont classées dans le type 5, la somme cystéine + cystine dans le type 6 et le tryptophane et l'arginine dans le type 7 (différence significative et non-équivalence). Les teneurs moyennes de ces cinq composés sont respectivement supérieures de 12 %, 26 %, 12 %, 17 % et 16 % dans le maïs VCO-01981-5 T par rapport aux variétés commerciales de référence. Dans tous les cas, les teneurs mesurées restent dans les plages de valeurs de la base de données de l'ILSI⁴.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 10 paramètres, dont certains sont classés dans le type 5 : floraisons mâle et femelle pour le maïs VCO-01981-5 NT et floraison mâle et rendement en grains pour le maïs VCO-01981-5 T. Afin de justifier ces résultats, le pétitionnaire fournit des « boxplots » mais il ne les analyse pas et conclut que ces résultats traduisent la variété naturelle des différentes variétés de maïs.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du maïs VCO-01981-5 ne devraient pas être différents de ceux issus de maïs conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, l'équivalence du maïs VCO-01981-5 avec des variétés conventionnelles de maïs n'est pas démontrée. Aucune analyse de composition n'a été réalisée sur les produits issus du maïs VCO-01981-5.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le pétitionnaire fonde l'évaluation de la sécurité de la protéine EPSPS ACE5 sur les éléments suivants :

- cette protéine appartient à la famille des EPSPS, qui comprend les formes naturellement présentes dans de nombreux organismes vivants (plantes, microorganismes, champignons, algues, etc.) - ces EPSPS ont par conséquent un historique d'utilisation sûre dans l'alimentation - ainsi que les formes CP4 EPSPS et mEPSPS, présentes dans différentes plantes génétiquement modifiées dont les évaluations ont été favorables (Cf. II.1.2.1.) ;
- une analyse *in silico*, réalisée à l'aide de bases de données actualisées (2014 ou 2015 selon les bases), montre que la protéine EPSPS ACE5 ne présente pas d'homologie de séquence ayant une signification biologique avec des protéines toxiques ou des allergènes connus et répertoriés dans ces bases de données (Cf. II.1.2.2. et II.1.5.1.) ;

⁴ ILSI (2014). International Life Sciences Institute, Crop Composition Database, Version 5.0 (<http://www.cropcomposition.org>)

- la protéine est présente en très faible quantité dans les parties de la plante qui sont consommées (Cf. II.1.2.2.) ;
- une protéine produite à l'aide d'une souche d'*E. coli*, dont l'équivalence (masse moléculaire, séquence en acides aminés, immunoréactivité, profil de glycosylation, séquence N-terminale et activité biologique) avec la protéine EPSPS ACE5 du maïs VCO-01981-5 a été démontrée, n'induit pas de mortalité chez la souris à la dose unique de 2000 mg/kg p.c. administrée par voie orale (gavage) ;
- la protéine présente une faible résistance à la protéolyse digestive et elle tend à perdre son activité fonctionnelle sous l'effet de températures élevées (Cf. II.1.2.1. et II.1.5.1.).

Selon le pétitionnaire, l'ensemble de ces données justifie l'absence d'étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur. Pour que cette position soit recevable, le pétitionnaire devra donner davantage d'éléments pour démontrer que la protéine EPSPS ACE5 peut effectivement être considérée comme les EPSPS ayant un historique d'utilisation sûre ou les EPSPS ayant fait l'objet d'évaluations favorables. En effet, sur la base des éléments présentés dans le dossier, il est difficile de savoir si la protéine EPSPS ACE5 se rapproche davantage de la protéine native du maïs ou de la protéine EPSPS GRG23 d'*A. globiformis* et aucune comparaison de séquence et de structure tridimensionnelle de cette protéine avec les protéines CP4 EPSPS et mEPSPS n'a été réalisée (Cf. II.1.2.1.). A défaut, le pétitionnaire devra fournir une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur, conformément aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013.

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

Le pétitionnaire estime avoir démontré que la composition du maïs VCO-01981-5 est équivalente à celle de variétés de maïs conventionnelles et qu'il n'y a donc pas lieu d'analyser d'autres constituants. Cette position n'est pas recevable, dans la mesure où l'équivalence du maïs VCO-01981-5 avec des variétés conventionnelles de maïs n'est pas démontrée (Cf. II.1.3.7.).

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou aliments pour animaux dérivés du maïs VCO-01981-5.

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

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été menée en 2013, selon la ligne directrice OCDE 408 (à l'exception du nombre de doses testées) et selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Quatre groupes de 12 rats mâles et 12 rats femelles, lignée Wistar, ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 33 % de la variété témoin HA0 (groupe 1) ;
- 16,5 % de la variété génétiquement modifiée VCO-01981-5 + 16,5 % de la variété témoin HA0 (groupe 2) ;
- 33 % de la variété génétiquement modifiée VCO-01981-5 (groupe 3) ;
- 33 % d'une variété commerciale non génétiquement modifiée (groupe 4).

Pour valider l'utilisation du maïs HA0 comme comparateur non génétiquement modifié, il est nécessaire que le pétitionnaire précise le lien entre ce génotype et ceux utilisés dans les autres études (B110, AAX1, AAX8, AAX9, AAX10 et CH02, Cf. II.1.2.1.). Par ailleurs, l'origine des grains de maïs utilisés pour préparer les régimes alimentaires n'est pas précisée. Il n'est donc pas possible de connaître la nature des traitements reçus par les plantes et de savoir si le maïs génétiquement modifié a été traité avec l'herbicide auquel il est tolérant. Enfin, le nombre

d'animaux (12 rats/groupe/sexe) ne correspond pas aux recommandations de l'Anses (2011) et du Comité scientifique de l'EFSA (2011) en la matière, et le pétitionnaire ne fournit pas d'analyse de la puissance, alors qu'il s'agit d'une exigence du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 en vigueur pour ce dossier.

Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux 4 groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants, toxines et résidus de pesticides. La seule exception est la fumonisine B1, dont la teneur semble un peu plus élevée dans les aliments préparés avec le maïs VCO-01981-5. Les teneurs en résidus de pesticides sont toutes inférieures à la limite de quantification de la méthode de mesure. Enfin, la stabilité des aliments pendant la durée de l'essai a été vérifiée.

Les résultats bruts sont fournis sous format électronique dans le dossier et les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS (version 9.2). Le pétitionnaire a réalisé des analyses de variance (ANOVA) et des tests de comparaison des moyennes entre groupes. Les résultats du groupe 4 n'ont pas été utilisés dans les analyses statistiques. L'erreur de type 1 a été fixée à 5 %. Les analyses ont été menées séparément pour les mâles et les femelles. Des modèles mixtes prenant en compte les corrélations entre mesures répétées dans le temps sur un même animal (poids et consommation) ont été utilisés. Enfin, les analyses ont été réalisées en considérant la cage comme l'unité expérimentale (2 animaux/sexe/cage). Des analyses individuelles ont également été réalisées. La comparaison des résultats obtenus avec ces deux méthodes montre qu'il n'y a pas d'effet cage.

Selon le pétitionnaire, les quelques différences significatives observées entre les groupes traités (groupes 2 et 3) et le groupe témoin (groupe 1) ne sont pas biologiquement pertinentes. A noter que les commentaires du pétitionnaire sur les paramètres biochimiques qui diffèrent statistiquement ne reflètent pas les valeurs présentées dans les tableaux qui par ailleurs ne mentionnent pas les significations statistiques.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

Les éléments présentés dans le dossier concernant la sécurité de la protéine EPSPS ACE5 exprimée dans le maïs VCO-01981-5 ne mettent pas en évidence un risque lié à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine mais ils sont insuffisants pour conclure. Le pétitionnaire devra présenter un argumentaire détaillé (comparaison de séquences protéiques, structures tridimensionnelles...) pour démontrer que la protéine EPSPS ACE5 peut effectivement être considérée comme les EPSPS ayant un historique d'utilisation sûre ou les EPSPS ayant fait l'objet d'évaluations favorables en termes de sécurité sanitaire. A défaut, il devra fournir une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur, conformément aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013.

Il devra également fournir les informations manquantes concernant l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur.

II.1.5. Allergénicité

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

Le pétitionnaire suit les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011) et fonde l'évaluation de l'allergénicité de la protéine EPSPS ACE5 sur quatre critères :

- 1) absence d'allergénicité connue de l'organisme source (*A. globiformis*) ;
- 2) absence d'identités globale et locale de séquence de la protéine EPSPS ACE5 avec des allergènes connus ;
- 3) faible résistance de cette protéine à la protéolyse digestive ;
- 4) faible teneur en protéine EPSPS ACE5 des grains et du fourrage du maïs VCO-01981-5.

La protéine EPSPS ACE5 présente une identité globale (> 35 % d'identité sur une fenêtre glissante de 80 acides aminés) avec deux allergènes de la banque AllergenOnLine FARRP (version 2014) : Amb a 4 (allergène majeur du pollen d'ambrosie, *Ambrosia artemisiifolia*) et Ani s 11 (allergène de l'anisakis, *Anisakis simplex*). Ces identités sont considérées comme fortuites.

Les analyses bio-informatiques ne montrent aucune homologie de séquence significative entre la protéine EPSPS ACE5 et les adjuvants classiques comme les toxines. La faible teneur de cette protéine dans le maïs VCO-01981-5 ainsi que sa sensibilité aux protéases digestives et à la température (Cf. II.1.2.1.) sont *a priori* incompatibles avec un éventuel effet adjuvant significatif dans le cadre d'un apport alimentaire modéré en maïs génétiquement modifié.

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

Le pétitionnaire rappelle, à juste titre, que le maïs n'est pas considéré comme un aliment allergénique majeur. Il ne figure pas dans la liste des allergènes dont l'étiquetage est obligatoire. Par ailleurs, le pétitionnaire fournit une étude dans laquelle la teneur de l'un des principaux allergènes du maïs, une protéine de transfert des lipides (LTP) de 9 kDa, a été mesurée dans les grains du maïs VCO-01981-5, du témoin non génétiquement modifié HA0 et de six variétés commerciales conventionnelles. Les résultats montrent que la teneur en LTP des grains du maïs VCO-01981-5 est comparable à celles du témoin HA0 et des six variétés commerciales conventionnelles. Toutefois, afin de savoir si l'utilisation du maïs HA0 comme comparateur non génétiquement modifié est recevable, il est nécessaire que le pétitionnaire précise le lien entre ce génotype et ceux utilisés dans les autres études (B110, AAX1, AAX8, AAX9, AAX10 et CH02, Cf. II.1.2.1.).

En conclusion, aucune des informations disponibles au sujet du maïs VCO-01981-5 ne laisse supposer que ce maïs puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de maïs conventionnelles. Le risque allergénique du maïs VCO-01981-5 est faible et *a priori* équivalent à celui des variétés de maïs conventionnelles.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des éléments fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique de la protéine EPSPS ACE5 exprimée dans le maïs VCO-01981-5 peut être considéré comme négligeable. Par ailleurs, cette protéine ne possède apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, l'allergénicité du maïs VCO-01981-5 reste vraisemblablement identique à celle d'un maïs conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Une étude d'alimentarité a été réalisée sur 420 poulets Ross 708 (210 mâles et 210 femelles) nourris pendant 42 jours avec trois régimes successifs (démarrage, croissance et finition) contenant 53 %, 57 % et 65 % de maïs, respectivement. Le maïs VCO-01981-5 a été comparé avec la variété témoin HA0 et avec la même variété commerciale non génétiquement modifiée que celle utilisée dans l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le Rat (Cf. II.1.4.4.). De même que précédemment, le pétitionnaire ne précise pas le lien entre le génotype HA0 et ceux utilisés dans les autres études (B110, AAX1, AAX8, AAX9, AAX10 et CH02, Cf. II.1.2.1.) et il n'indique pas si le maïs VCO-01981-5 a été traité avec l'herbicide auquel il est tolérant. Par ailleurs, le taux de mortalité globale de 10,2 %, sans doute lié au fait que l'essai a été mené en cages et non au sol, ne permet pas de détecter un éventuel effet nutritionnel.

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

Les estimations de consommation de maïs chez l'animal sont basées sur les données présentées dans les publications de Chiba (2014a, b et c), Lammers *et al.* (2007) et Trenkle (2002). Dans un

scénario du "pire des cas", la plus forte exposition à la protéine EPSPS ACE5 exprimée dans le maïs VCO-01981-5 serait celle des poulets à 7 jours (285 µg/kg p.c./jour).

L'évaluation de l'exposition humaine à la protéine EPSPS ACE5 est fondée sur l'utilisation de l'EFSA Comprehensive European Food Consumption Database⁵ et des données du programme GEMS/Food de l'OMS (2003). Dans un scénario du "pire des cas", l'exposition moyenne à cette protéine serait comprise entre 4,4 et 41,5 µg/personne/jour pour les adolescents et entre 2,6 et 22,8 µg/personne/jour pour les adultes lorsque les calculs sont réalisés avec les données de l'EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. Elle serait au maximum de 20,4 µg/personne/jour lorsque les calculs sont basés sur les données du programme GEMS/Food de l'OMS (2003).

II.3 Caractérisation des risques

En l'absence d'étude de toxicité sur des animaux de rente et compte tenu du fait que l'étude d'alimentarité ne permet pas de détecter un éventuel effet nutritionnel (Cf. II.1.6.), le risque ne peut pas être caractérisé pour ces animaux.

Chez l'Homme, le pétitionnaire présente un calcul de marge de sécurité fondé sur les résultats de l'étude de toxicité aiguë orale sur la souris de la protéine EPSPS ACE5. Le GT « Biotechnologie » considère que cette démarche n'est pas adaptée, car elle ne permet pas d'estimer le risque associé à une consommation répétée de produits issus du maïs VCO-01981-5. Il serait plus pertinent de calculer une marge de sécurité à partir des doses sans effet néfaste observé (NOAEL) pouvant être déduites de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours, moyennant que les informations manquantes concernant cette étude soient fournies et permettent de considérer qu'elle est pleinement recevable.

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

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

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

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du maïs VCO-01981-5 ne sont pas évocateurs d'un risque lié à l'utilisation de ce maïs en alimentation animale ou humaine et le potentiel allergénique des produits dérivés de ce maïs paraît négligeable.

En revanche, les informations présentées dans le dossier ne sont pas suffisantes pour que la protéine EPSPS ACE5 puisse être considérée comme les EPSPS ayant un historique d'utilisation sûre ou les EPSPS ayant fait l'objet d'évaluations favorables. Le pétitionnaire devra donner davantage d'éléments pour le démontrer. A défaut, il devra fournir une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur, conformément aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013. Par ailleurs, l'évaluation comparative ne suit pas les recommandations de l'EFSA et ne permet pas de démontrer l'équivalence du maïs VCO-01981-5 avec des variétés conventionnelles. Les conditions de réalisation de l'étude d'alimentarité ne permettent pas de détecter un éventuel effet nutritionnel de ce maïs. Le pétitionnaire devra aussi fournir les compléments d'information demandés sur l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur.

Dans ces conditions, le GT « Biotechnologie » ne peut se prononcer sur la sécurité sanitaire du maïs VCO-01981-5.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie » et émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs VCO-01981-5 au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

Roger GENET

MOTS-CLES

OGM, maïs VCO-01981-5, tolérance au glyphosate, EPSPS ACE5
GMO, VCO-01981-5 maize, glyphosate tolerance, EPSPS ACE5

BIBLIOGRAPHIE

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

Chiba LI (2014a). Section 11: Pig Nutrition and Feeding. In Animal Nutrition Handbook. Third Revision. 379-409.

<http://www.ag.auburn.edu/~chibale/animalnutrition.html>.

Chiba LI (2014b). Section 12: Poultry Nutrition and Feeding. *In* Animal Nutrition Handbook. Third Revision. 410-425.

(<http://www.ag.auburn.edu/~chibale/animalnutrition.html>).

Chiba LI (2014c). Section 15: Dairy Cattle Nutrition and Feeding. *In* Animal Nutrition Handbook. Third Revision. 486-519.

(<http://www.ag.auburn.edu/~chibale/animalnutrition.html>).

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. *The EFSA Journal* 2006; 99: 1-100.

EFSA GMO Panel (2010). Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *The EFSA Journal* 2010; 8(1): 1250.

EFSA GMO Panel (2011). Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *The EFSA Journal* 2011; 9(5): 2150, 37 pp.

EFSA Scientific Committee (2011). EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. *EFSA Journal* 2011;9(12): 2438 [21 pp.].

James C (2014). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Brief No. 49*. ISAAA: Ithaca, NY.

Lammers PJ, Stender DR et Honeyman MS (2007). Feedstuffs for pigs. Section 320. *In* Niche Pork Production Handbook. Iowa State University. 101 p.

(<http://www.ipic.iastate.edu/publications/IPICNPP.pdf>).

Lawrence CJ, Dong Q, Polacco ML, Seigfried TE et Brendel V (2004). MaizeGDB, the community database for maize genetics and genomics. *Nucleic Acids Research*, **32**: D393-D397.

OCDE (1998). Guideline for testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris, France.

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

Règlement (CE) N° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.

Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.

Trenkle A (2002). Relative value of white corn when fed to finishing cattle and its effects on color of carcass fat. *In* Beef Research Report - Iowa State University. A.S. Leaflet R1775. 2 p.

(<http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/beefreports/asl1775.pdf>)