



HAL
open science

AVIS en réponse à la saisine HCB - dossier 2020-172. Paris, le 06 septembre 2021

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno B. Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, et al.

► **To cite this version:**

. Comité Scientifique Du Haut Conseil Des Biotechnologies, Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, et al.. AVIS en réponse à la saisine HCB - dossier 2020-172. Paris, le 06 septembre 2021. [0] Haut Conseil des Biotechnologies. 2021, 26 p. hal-03752894

HAL Id: hal-03752894

<https://hal.inrae.fr/hal-03752894v1>

Submitted on 17 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine HCB - dossier 2020-172¹.

Paris, le 06 septembre 2021

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 22 juin 2021 par les autorités compétentes françaises (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation) d'une demande d'avis relative au dossier **EFSA-GMO-NL-2020-172** de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **DP915635** à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par la société **Pioneer Hi-Bred International, Inc.** auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement du **règlement (CE) n° 1829/2003**. Dans le cadre de ce règlement, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Les Etats membres disposent de trois mois pour envoyer leurs commentaires à l'EFSA en contribution à l'évaluation du dossier.

Dans ce contexte, le HCB est invité à proposer des commentaires à destination de l'EFSA au plus tard le 07 septembre 2021.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a examiné le dossier en séance du 26 août 2021 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été discuté en séance du 26 août 2021 et a été adopté par voie électronique le 03 septembre 2021 et publié le 17 septembre 2021.

¹ La saisine « **HCB- dossier 2020-172** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² Les modalités de l'élaboration de l'avis et la composition du CS sont indiquées dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi sur le fondement du règlement (CE) n° 1829/2003 d'une demande d'avis relative au dossier EFSA-GMO-NL-2020-172 dans le but de proposer des commentaires à destination de l'EFSA en contribution à l'évaluation européenne du dossier, et d'éclairer les autorités compétentes françaises dans une étape intermédiaire en amont du vote à la Commission européenne. Déposé par la société Pioneer Hi-Bred International, Inc., ce dossier est une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié DP915635 à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale dans l'Union européenne.

Description du produit

Le maïs DP-915635-4 (également appelé DP915635) a été modifié génétiquement par introduction, dans un locus prédéfini et précis du génome, d'un insert porteur du gène *ipd079Ea* originaire de la plante *Ophioglossum pendulum*, dont la protéine IPD079Ea est active contre certains coléoptères et en particulier la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera*. L'insert porte également une version optimisée du gène *mo-pat*, exprimant l'enzyme phosphinothricine acétyl transférase (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, conférant une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium et le gène *pmi* originaire de la souche d'*Escherichia coli* K-12, codant une phosphomannose isomérase (PMI) permettant la sélection des cellules végétales transformées génétiquement.

Le maïs DP915635 a été obtenu par une intégration spécifique de site reposant sur deux étapes séquentielles de transformation. Ces étapes permettent (1) l'insertion d'une séquence de site d'intégration (« *landing pad* ») à un emplacement spécifique du génome du maïs par un processus d'insertion ciblée médié par le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9*) délivré par bombardement, puis (2) l'insertion par recombinaison des cassettes d'expression des gènes énumérés plus haut, à partir de la région de l'ADN-T du plasmide PHP83175, dans le « *landing pad* » par une transformation médiée par *Agrobacterium tumefaciens*.

La caractérisation moléculaire et génétique du maïs DP915635 indique que l'ADN-T portant les cassettes d'expression des gènes *ipd079Ea*, *pmi*, *mo-pat* est présent en un locus unique, sur le chromosome 1 du maïs. Le caractère de tolérance au glufosinate d'ammonium dans le maïs DP915635 est stable sur cinq générations. L'étude de la descendance en ségrégation est en accord avec une hérédité mendélienne d'un locus unique. Aucun autre transgène que ceux portés par le fragment d'ADN-T transféré n'est détecté dans le génome du maïs DP915635. Aucun des cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels identifiés dans l'insert et à la jonction de celui-ci ne présente d'homologie significative avec des allergènes ou des toxines connus. Les analyses bioinformatiques indiquent qu'aucune séquence codante ou régulatrice connue de maïs n'est interrompue par l'insertion de l'ADN-T.

Remarques générales à destination de l'EFSA

Commentaire préliminaire :

Deux instances sont chargées de l'évaluation de ce type de dossier en France : le Haut Conseil des biotechnologies (HCB), saisi par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (MAA), et

³ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), saisie par le ministère de l'Economie et des Finances (MEF). De manière complémentaire, les commentaires concernant l'évaluation environnementale du dossier sont envoyés par le HCB *via* le MAA et les commentaires concernant l'évaluation sanitaire du dossier sont envoyés par l'Anses *via* le MEF.

Remarques principales :

1. Concernant l'analyse moléculaire :

Deux Annexes importantes citées dans le dossier principal EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, nécessaires à l'analyse moléculaire, manquent au dossier : 1) Annexe PHI-2019-245 qui présente les résultats du séquençage de l'insert ; 2) Annexe PHI-2020-044/040 décrivant en détail le nombre de sites d'insertion et de copies des transgènes. Il est indispensable que ces Annexes soient incluses dans le dossier⁴.

La séquence en acides aminés de la protéine IPD079Ea est fournie dans le dossier principal EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, mais en raison de l'absence de l'Annexe PHI-2019-245, la séquence nucléotidique du gène *ipd079Ea* n'est pas accessible dans les documents transmis au CS du HCB. De plus en l'absence des annexes, les analyses effectuées sur la séquence protéique conduisent le CS à s'interroger sur la certitude de l'origine du gène exprimé dans le maïs DP-915635-4. En raison de fortes similitudes avec des perforines bactériennes, le CS ne peut valider une origine végétale.

Le CS note le manque de données importantes concernant le mode d'action de la protéine IPD079Ea. Les effets sur les cellules épithéliales de l'intestin des larves d'insectes sensibles ne sont pas décrits. Il n'est pas indiqué si cette protéine reconnaît un/des récepteurs spécifiques ou se fixe sur des récepteurs non spécifiques.

Le dossier comporte peu d'informations concernant la première étape de transformation génétique qui aboutit à l'insertion, dans un site prédéfini du génome du maïs. En particulier, rien n'est donné de la séquence porteuse du site d'intégration spécifique des transgènes. Le choix de la zone d'insertion n'est pas argumenté et la possibilité de modifications hors-cibles résultant de la stratégie CRISPR-Cas9 n'est pas évoquée dans le dossier.

Le CS a noté que la stabilité phénotypique de la résistance à *Diabrotica virgifera virgifera* conférée par l'expression du gène *ipd079Ea* n'est pas établie par les données contenues dans le dossier. Ce point pourrait être éclairci par des dosages de la protéine IPD079Ea par la technique ELISA, sur cinq générations.

2. Concernant l'évaluation des risques pour l'environnement :

Le CS demande que les sections traitant des organismes cibles et non-cibles soient complétées. Pour les organismes cibles, des données concernant les fourchettes de concentrations de protéine IPD079Ea ingérées par les larves des insectes cibles devront être déterminées. Idéalement, il faudrait déterminer la DL₅₀ de la protéine IPD079Ea sur les larves de *Diabrotica*. Le mécanisme d'action de la protéine devra être précisé afin d'évaluer l'émergence potentielle de résistance. Une

⁴ Des informations complémentaires ont été reçues postérieurement à l'analyse du dossier par le Comité scientifique du HCB. Elles ont été remises à l'EFSA par le pétitionnaire le 01 septembre 2021 et communiquées au HCB le 06 septembre 2021. Ces informations pourraient apporter des réponses aux questions soulevées par le Comité scientifique. Elles n'ont pas été prises en compte en raison de leur transmission tardive.

évaluation plus complète du spectre d'action insecticide de la protéine IPD079Ea devrait aussi être fournie, notamment sur d'autres insectes coléoptères tels que la coccinelle.

Le dossier ne se réfère qu'à une importation dans les régions de l'Union européenne de climat tempéré. Or, l'Union européenne comprend également des régions ultrapériphériques situées en zones tropicales plus propices à la persistance du maïs. C'est le cas pour certains départements et régions d'outre-mer du territoire français. Le CS du HCB souhaite que les caractéristiques environnementales particulières de ces régions soient considérées dans l'évaluation des risques et les plans de surveillance des dossiers de mise sur le marché de graines issues de plantes génétiquement modifiées dans l'Union européenne. Une alternative serait d'exclure ces zones géographiques particulières du périmètre de la mise sur le marché.

Le CS note que le dossier ne prend pas en compte la présence, dans l'Union européenne, de populations de téosintes sexuellement compatibles avec le maïs cultivé et le risque associé à la possibilité d'un transfert de gènes du maïs DP-915635-4 à des téosintes. La certitude de présence des téosintes est établie depuis plusieurs années, ce risque doit donc être considéré.

3. Concernant les rapports de surveillance et le plan de surveillance post-commercialisation :

Le plan de surveillance générale correspond aux exigences réglementaires de l'Union européenne.

Le pétitionnaire a pris en compte la nécessité de mesures appropriées pour qu'un échappement accidentel ne se produise pas ou soit limité, sachant que d'éventuels traitements mécaniques ou chimiques autres que les herbicides à base de glufosinate (interdit en France) sont disponibles pour les traiter.

Le CS demande néanmoins au pétitionnaire de se rapprocher des autorités en charge de la biosurveillance dans les Etats membres, afin d'harmoniser avec elles et sous leur contrôle les mesures de surveillance à mettre en œuvre. Les mesures de surveillance devront être adaptées au contexte spécifique de chaque Etat membre, prenant notamment en compte les régions où des populations de téosintes ont été signalées.

Le CS rappelle que le rapport annuel devra informer des volumes des importations réalisées dans chaque Etat membre. Il devra être établi selon le format standard établi par la Commission européenne (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*).

Il est enfin recommandé que la surveillance générale soit poursuivie autant que nécessaire pour permettre de prendre en compte d'éventuelles repousses associées à l'écoulement du stock de graines en circulation dans la filière après la fin de la période d'autorisation de mise sur le marché du maïs DP915635.

Remarques supplémentaires :

Le CS du HCB rappelle que l'Union européenne a ratifié la Convention sur la diversité biologique, qui indique que les pays exportateurs comme importateurs ont des responsabilités internationales en matière de diversité biologique.

Dans ce cadre, certains membres du CS du HCB soulignent qu'il importe de prendre en compte dans ses décisions l'impact de la culture du maïs DP-915635-4 dans les pays tiers exportateurs sur la biodiversité. Dans cette perspective, et considérant que la diversité biologique des pays importateurs et exportateurs est liée, ils souhaiteraient que le dossier fasse état des données existantes concernant l'impact de cette culture sur la biodiversité des pays producteurs exportateurs.

De plus, ils recommandent que le régulateur prenne en compte dans ses décisions l'influence de l'importation de certains produits, qu'ils soient transgéniques ou non, sur le choix des cultures en Europe, et sur la biodiversité résultant des agrosystèmes associés.

Certains membres du HCB soulèvent également la question éthique d'autoriser l'importation dans l'Union européenne d'un produit dont la production dans les pays exportateurs impliquera l'exposition des opérateurs à un produit phytopharmaceutique (à base de glufosinate d'ammonium) qui a été retiré du marché français pour des raisons sanitaires.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	7
1.1. CONTEXTE REGLEMENTAIRE DE LA SAISINE	7
1.2. HISTORIQUE DU DOSSIER	8
1.3. PRESENTATION DE LA PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE.....	8
2. COMMENTAIRES A DESTINATION DE L'EFSA	9
2.1. REMARQUES GENERALES	9
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DEFINIES PAR L'EFSA.....	12
3. BIBLIOGRAPHIE.....	16
ANNEXE 1 : SAISINE	18
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	19
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS A DESTINATION DE L'EFSA	20
A3.1. GENERAL COMMENTS	20
A3.2. COMMENTS PER SECTION	22

1. Introduction

Contexte réglementaire de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 22 juin 2021 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2020-172, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs génétiquement modifié DP915635 à des fins d'importation, transformation et alimentation humaine et animale dans l'Union européenne. Le dossier EFSA-GMO-NL-2020-172 a été déposé par la société Pioneer Hi-Bred International, Inc. auprès des autorités compétentes néerlandaises sur le fondement du règlement (CE) n° 1829/2003⁵ (EC, 2003).

Dans le cadre du règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées est centralisée par l'EFSA⁶, qui dispose d'un délai de 6 mois, à compter de la date de validation du dossier, pour transmettre son avis à la Commission européenne. En pratique, le décompte de cette période de six mois est suspendu à chaque demande d'information supplémentaire adressée au pétitionnaire.

En parallèle, les Etats membres disposent d'un délai ferme de trois mois pour envoyer leurs commentaires à l'EFSA en contribution à l'évaluation sanitaire et environnementale du dossier. En France, les autorités compétentes saisissent d'une part l'Anses (l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), pour réaliser l'évaluation sanitaire du dossier, et d'autre part le HCB, pour réaliser l'évaluation environnementale associée à un risque de dissémination de l'OGM. En l'absence d'un tel risque (par exemple, dans le cas d'une mise sur le marché de produits dérivés d'OGM comme des tourteaux de soja), seule l'Anses est saisie. La France couvre ainsi les deux pans de l'évaluation réalisée par l'EFSA.

Les commentaires des Etats membres, dès réception par l'EFSA, sont transmis d'une part aux experts de trois groupes de travail du panel OGM⁷ de l'EFSA (Analyse moléculaire, Alimentation humaine et animale, Environnement), et d'autre part à l'Etat membre auquel l'EFSA a délégué l'évaluation du risque environnemental. En l'occurrence, la culture étant exclue du champ de demande d'autorisation de ce dossier, l'EFSA a choisi de ne pas déléguer cette évaluation.

Les groupes de travail de l'EFSA examinent les commentaires des Etats membres, les intègrent dans leur analyse des dossiers, et, quand ils le jugent pertinent, les transmettent au pétitionnaire sous forme de questions pour clarification ou demande d'information supplémentaire. Si tous les commentaires ne sont pas nécessairement transmis au pétitionnaire, ils font tous l'objet d'une réponse spécifique par l'EFSA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'EFSA, sont rendus publics, en annexe de l'avis scientifique de l'EFSA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'EFSA est strictement cadrée. Les autorités compétentes des Etats membres sont invitées à poster des commentaires en ligne, en anglais, dans des formulaires distincts pour chaque section des dossiers. Les sections sont basées sur la structure des dossiers établie par le règlement (CE) n° 1829/2003, détaillée par le règlement d'exécution

⁵ 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. (Plus précisément, pour clarifier une confusion inhérente à la traduction française de ce titre, ce règlement concerne les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, ces denrées alimentaires ou aliments pour animaux pouvant consister en des OGM, contenir des OGM, ou être issus d'OGM.): <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>.

⁶ EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments, traduction de *European Food Safety Authority*.

⁷ OGM : organisme génétiquement modifié.

(UE) n° 503-2013⁸ (EU, 2013), et explicitée dans le document d'orientation de l'EFSA relatif à la soumission de dossiers de demande d'autorisation de plantes génétiquement modifiées à des fins alimentaires (EFSA, 2013). Ces commentaires doivent être ciblés sur des demandes spécifiques adressées à l'EFSA, soit pour une demande de clarification ou d'information supplémentaire de la part du pétitionnaire, soit pour la prise en compte de remarques spécifiques dans son évaluation des dossiers et l'élaboration de son avis scientifique.

C'est dans ce cadre que le HCB a été saisi. L'objectif de cet avis du HCB est donc de contribuer à l'évaluation environnementale du dossier par l'EFSA.

En fin d'évaluation, la Commission européenne soumettra au vote des Etats membres un projet de décision concernant l'autorisation de mise sur le marché du maïs DP915635 dans l'Union européenne, élaboré sur la base de l'avis de l'EFSA. Le HCB pourra à nouveau être saisi par les autorités compétentes françaises pour qu'il puisse réviser son évaluation selon les informations supplémentaires versées au dossier depuis son évaluation initiale. A ce stade ultérieur, le HCB rédigera un avis fournissant un éclairage complet sur le dossier à destination du Gouvernement.

Historique du dossier

Le 14 décembre 2020, Pioneer Hi-Bred International, Inc. a soumis aux autorités néerlandaises un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du maïs DP915635 (identifiant unique DP-915635-4) pour l'importation, la transformation et l'alimentation humaine et animale dans l'Union européenne.

Le 15 décembre 2020, conformément au règlement (CE) 1829/2003, les autorités néerlandaises ont transmis le dossier à l'EFSA. Le 21 décembre 2020, l'EFSA a enregistré le dossier sous la référence EFSA-GMO-NL-2020-172. Après vérification de sa conformité réglementaire, qui a nécessité une demande de complément d'information au pétitionnaire, l'EFSA a validé le dossier le 11 juin 2021, et l'a soumis à consultation des Etats membres jusqu'au 13 septembre 2021.

Présentation de la plante génétiquement modifiée

Le maïs DP-915635-4 (également appelé DP915635) a été modifié génétiquement par introduction, dans un locus prédéfini et précis du génome, d'un insert porteur du gène *ipd079Ea* originaire de la plante *Ophioglossum pendulum*, dont la protéine IPD079Ea est active contre certains coléoptères et en particulier la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera*. L'insert porte également une version optimisée du gène *mo-pat*, exprimant l'enzyme phosphinothricine acétyl transférase (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, conférant une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium et le gène *pmi* originaire de la souche d'*Escherichia coli* K-12, codant une phosphomannose isomérase (PMI) permettant la sélection des cellules végétales transformées génétiquement.

Le maïs DP915635 a été obtenu par une intégration spécifique de site reposant sur deux étapes séquentielles de transformation. Ces étapes permettent (1) l'insertion d'une séquence de site d'intégration (« *landing pad* ») à un emplacement spécifique du génome du maïs à l'aide d'un bombardement de microprojectiles et d'un processus d'insertion ciblée médié par le système CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9), puis (2) l'insertion par recombinaison des cassettes d'expression prévues, à partir de la région de l'ADN-T du plasmide PHP83175, dans le *landing pad* par une transformation médiée par *Agrobacterium tumefaciens*.

⁸ 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 : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:157:0001:0048:FR:PDF>

La caractérisation moléculaire et génétique du maïs DP915635 indique que l'ADN-T portant les cassettes d'expression des gènes *ipd079Ea*, *pmi*, *mo-pat* est présent en un locus unique, sur le chromosome 1 du maïs. Le caractère de tolérance au glufosinate d'ammonium du maïs DP915635 est stable sur cinq générations. L'étude de la descendance en ségrégation est en accord avec une héritabilité mendélienne d'un locus unique. Aucun autre transgène que celui formé du fragment transféré n'est détecté dans le génome du maïs DP915635. Aucun des cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels identifiés dans l'insert et à la jonction de celui-ci ne présente d'homologie significative avec des allergènes ou des toxines connus. Les analyses bioinformatiques indiquent qu'aucune séquence codante ou régulatrice connue de maïs n'est interrompue par l'insertion de l'ADN-T.

Transgènes et fonctions

Le maïs DP-915635-4 exprime, en un site spécifique prédéterminé, les trois gènes suivants :

- Le gène *ipd079Ea* originaire de la plante *Ophioglossum pendulum* (ordre des Ophioglossales, famille des Ophioglossaceae ; nom commun « ophioglosse pendant »). Cette fougère est native d'Inde, d'Australie, de certaines régions d'Afrique et du Sud Est de l'Asie, elle a été également observée en Floride. La protéine IPD079Ea, d'une masse moléculaire d'environ 52 kDa, est active contre certains coléoptères et en particulier la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera*. Cette protéine détruirait les cellules épithéliales de l'intestin des larves d'insectes sensibles et constituerait donc une alternative à l'utilisation de protéines Bt.
- Une version optimisée du gène *mo-pat*, exprimant l'enzyme phosphinothricine acétyl transférase (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes*, conférant une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium. La phosphinothricine acétyl transférase acétyle le glufosinate d'ammonium et le transforme en une forme inactive, le N-acétyl glufosinate. Le glufosinate d'ammonium est un herbicide à large spectre. Il inhibe l'activité de la glutamine synthétase, entraînant ainsi une accumulation létale d'ammoniac dans les cellules végétales.
- Le gène *pmi* de la souche d'*Escherichia coli* K-12, codant une phosphomannose isomérase (PMI) catalysant la formation de fructose-6-phosphate à partir de mannose-6-phosphate. Ce gène, dont l'expression permet aux cellules végétales d'utiliser le mannose comme source de carbone, est utilisé comme marqueur de sélection des cellules transformées de maïs DP-915635-4.

Le pétitionnaire présente dans ce dossier l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires associés à l'importation, la transformation et l'utilisation dans l'alimentation humaine et animale du maïs DP915635 dans l'Union européenne. Le CS du HCB propose d'envoyer les remarques suivantes à l'EFSA concernant les points du dossier identifiés comme nécessitant des éclaircissements et des données pour l'évaluation des risques environnementaux. Les commentaires concernant l'évaluation des risques sanitaires seront envoyés par l'Anses.

2. Commentaires à destination de l'EFSA

2.1. Remarques générales

Commentaire préliminaire :

Deux instances sont chargées de l'évaluation de ce type de dossier en France : le Haut Conseil des biotechnologies (HCB), saisi par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (MAA), et

l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), saisie par le ministère de l'Economie et des Finances (MEF). De manière complémentaire, les commentaires concernant l'évaluation environnementale du dossier sont envoyés par le HCB via le MAA et les commentaires concernant l'évaluation sanitaire du dossier sont envoyés par l'Anses via le MEF.

Remarques principales :

1. Concernant l'analyse moléculaire :

Deux Annexes importantes citées dans le dossier principal EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, nécessaires à l'analyse moléculaire, manquent au dossier : 1) Annexe PHI-2019-245 qui présente les résultats du séquençage de l'insert ; 2) Annexe PHI-2020-044/040 décrivant en détail le nombre de sites d'insertion et de copies des transgènes. Il est indispensable que ces Annexes soient incluses dans le dossier⁴.

La séquence en acides aminés de la protéine IPD079Ea est fournie dans le dossier principal EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, mais en raison de l'absence de l'Annexe PHI-2019-245, la séquence nucléotidique du gène *ipd079Ea* n'est pas accessible dans les documents transmis au CS du HCB. De plus en l'absence des annexes, les analyses effectuées sur la séquence protéique conduisent le CS à s'interroger sur la certitude de l'origine du gène exprimé dans le maïs DP-915635-4. En raison de fortes similitudes avec des perforines bactériennes, le CS ne peut valider une origine végétale.

Le CS note le manque de données importantes concernant le mode d'action de la protéine IPD079Ea. Les effets sur les cellules épithéliales de l'intestin des larves d'insectes sensibles ne sont pas décrits. Il n'est pas indiqué si cette protéine reconnaît un/des récepteurs spécifiques ou se fixe sur des récepteurs non spécifiques.

Le dossier comporte peu d'informations concernant la première étape de transformation génétique qui aboutit à l'insertion, dans un site prédéfini du génome du maïs. En particulier, rien n'est donné de la séquence porteuse du site d'intégration spécifique des transgènes. Le choix de la zone d'insertion n'est pas argumenté et la possibilité de modifications hors-cibles résultant de la stratégie CRISPR-Cas9 n'est pas évoquée dans le dossier.

Le CS a noté que la stabilité phénotypique de la résistance à *Diabrotica virgifera virgifera* conférée par l'expression du gène *ipd079Ea* n'est pas établie par les données contenues dans le dossier. Ce point pourrait être éclairci par des dosages de la protéine IPD079Ea par la technique ELISA, sur cinq générations.

2. Concernant l'évaluation des risques pour l'environnement :

Le CS demande que les sections traitant des organismes cibles et non-cibles soient complétées. Pour les organismes cibles, des données concernant les fourchettes de concentrations de protéine IPD079Ea ingérées par les larves des insectes cibles devront être déterminées. Idéalement, il faudrait déterminer la DL₅₀ de la protéine IPD079Ea sur les larves de *Diabrotica*. Le mécanisme d'action de la protéine devra être précisé afin d'évaluer l'émergence potentielle de résistance. Une évaluation plus complète du spectre d'action insecticide de la protéine IPD079Ea devrait aussi être fournie, notamment sur d'autres insectes coléoptères tels que la coccinelle.

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

environnementales particulières de ces régions soient considérées dans l'évaluation des risques et les plans de surveillance des dossiers de mise sur le marché de graines issues de plantes génétiquement modifiées dans l'Union européenne. Une alternative serait d'exclure ces zones géographiques particulières du périmètre de la mise sur le marché.

Le CS note que le dossier ne prend pas en compte la présence, dans l'Union européenne, de populations de téosintes sexuellement compatibles avec le maïs cultivé et le risque associé à la possibilité d'un transfert de gènes du maïs DP-915635-4 à des téosintes. La certitude de présence des téosintes est établie depuis plusieurs années, ce risque doit donc être considéré.

3. Concernant les rapports de surveillance et le plan de surveillance post-commercialisation :

Le plan de surveillance générale correspond aux exigences réglementaires de l'Union européenne.

Le pétitionnaire a pris en compte la nécessité de mesures appropriées pour qu'un échappement accidentel ne se produise pas ou soit limité, sachant que d'éventuels traitements mécaniques ou chimiques autres que les herbicides à base de glufosinate (interdit en France) sont disponibles pour les traiter.

Le CS demande néanmoins au pétitionnaire de se rapprocher des autorités en charge de la biosurveillance dans les Etats membres, afin d'harmoniser avec elles et sous leur contrôle les mesures de surveillance à mettre en œuvre. Les mesures de surveillance devront être adaptées au contexte spécifique de chaque Etat membre, prenant notamment en compte les régions où des populations de téosintes ont été signalées.

Le CS rappelle que le rapport annuel devra informer des volumes des importations réalisées dans chaque Etat membre. Il devra être établi selon le format standard établi par la Commission européenne (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*).

Il est enfin recommandé que la surveillance générale soit poursuivie autant que nécessaire pour permettre de prendre en compte d'éventuelles repousses associées à l'écoulement du stock de graines en circulation dans la filière après la fin de la période d'autorisation de mise sur le marché du maïs DP915635.

Remarques supplémentaires :

Le CS du HCB rappelle que l'Union européenne a ratifié la Convention sur la diversité biologique, qui indique que les pays exportateurs comme importateurs ont des responsabilités internationales en matière de diversité biologique.

Dans ce cadre, certains membres du CS du HCB soulignent qu'il importe de prendre en compte dans ses décisions l'impact de la culture du maïs DP-915635-4 dans les pays tiers exportateurs sur la biodiversité. Dans cette perspective, et considérant que la diversité biologique des pays importateurs et exportateurs est liée, ils souhaiteraient que le dossier fasse état des données existantes concernant l'impact de cette culture sur la biodiversité des pays producteurs exportateurs.

De plus, ils recommandent que le régulateur prenne en compte dans ses décisions l'influence de l'importation de certains produits, qu'ils soient transgéniques ou non, sur le choix des cultures en Europe, et sur la biodiversité résultant des agrosystèmes associés.

Certains membres du HCB soulèvent également la question éthique d'autoriser l'importation dans l'Union européenne d'un produit dont la production dans les pays exportateurs impliquera l'exposition des opérateurs à un produit phytopharmaceutique (à base de glufosinate d'ammonium) qui a été retiré du marché français pour des raisons sanitaires.

Commentaires par sections définies par l'EFSA

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections réglementaires du dossier et aux différents formulaires mis à disposition par l'EFSA pour la collecte de commentaires en ligne. Seules les sections pour lesquelles le HCB transmet des commentaires sont indiquées ici. Chaque commentaire est écrit de manière indépendante. La somme des commentaires n'est pas destinée à constituer un texte en soi.

1. Hazard identification and characterisation

1.1. Information relating to the recipient or (where appropriate) parental plants

ii) Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species (EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 11)

L'analyse des risques de dispersion par flux de gènes avec des espèces apparentées est insuffisante puisqu'elle ne prend pas en compte la présence de populations de téosintes en France et en Espagne. Deux publications (Devos *et al.*, 2018 ; EFSA, 2016a) sont certes citées dans le dossier, mais les éléments factuels qu'elles contiennent ne sont pas repris dans l'analyse, voire remis en question.

Le CS souligne qu'il existe des publications récentes mettant en évidence la présence d'hybrides et/ou de flux de gènes entre maïs cultivé et téosintes européennes (Diaz *et al.*, 2020 ; Le Corre *et al.*, 2020 ; Lohn *et al.*, 2021). Ces publications devraient être citées dans le dossier.

1.2. Molecular Characterisation

1.2.1. Information relating to the genetic modification

1.2.1.1. Description of the methods used for the genetic modification

Event development process for DP915635 maize (EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 53)

La méthodologie suivie pour l'obtention du maïs DP915635 est décrite de façon très succincte :

« DP915635 maize was developed by site-specific integration (SSI; Anand *et al.*, 2019) using two sequential transformation steps to (1) insert an integration site sequence (referred to as a "landing pad" sequence) at a specific location of the maize genome using microprojectile bombardment and a clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9 (CRISPR-Cas9)-mediated targeted insertion process, and (2) insert, via recombination, the intended expression cassettes from the plasmid PHP83175 T-DNA region into the landing pad in the maize genome using *Agrobacterium*-mediated transformation, using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. »

Si l'Appendix B6 du dossier fournit une description détaillée des cinq plasmides utilisés pour obtenir le maïs, le CS aurait souhaité que :

- le choix de la zone d'insertion dans le génome du maïs par l'ARN guide soit argumenté
- la possibilité de modifications hors-cibles résultant de la stratégie CRISPR-Cas9 soit abordée à tout le moins par une recherche *in silico*
- les expérimentations conduites afin d'effectuer la caractérisation moléculaire du maïs transgénique obtenu après la première étape de transformation génétique soient présentées dans le dossier.

Le CS s'est également interrogé sur la nature des explants choisis pour la seconde étape de transformation génétique.

1.2.1.3. Source of donor nucleic acid(s) used for transformation, size, and intended function of each constituent fragment of the region intended for insertion

***Ophioglossum pendulum* : donor of the *ipd079Ea* gene** (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 16)

Innocuité de la protéine IPD079E

L'origine du gène *ipd079Ea*, la fougère *O. pendulum*, est présentée comme un gage d'innocuité de la protéine vis-à-vis des humains et du bétail (Main text Part II, 1.2.1.3., page 38). Rien n'indique que la protéine IPD079Ea soit produite en quantité suffisante par la plante pour avoir un effet toxique sur des humains ou des animaux de rente. Ce, de plus, car il n'est pas démontré que la fougère est effectivement ingérée par ces mammifères.

Le CS juge que cet argumentaire concernant l'innocuité de la protéine IPD079Ea n'est pas recevable.

Analyse de la séquence de la protéine IPD079E

La protéine IPD079Ea est une protéine d'environ 52 kDa dont le gène a été cloné à partir de la fougère *Ophioglossum pendulum*. Il est indiqué dans le brevet WO2017023486A1 que le gène *ipd079Ea* "was amplified from cDNA prepared from the total RNA from *Ophioglossum pendulum* using forward primer of SEQ ID NO: 1251 and reverse primer of SEQ ID NO: 1252. The resulting PCR product was subcloned...". En fait le gène *ipd079Ea* a été cloné par homologie avec le gène *ipd079Aa* précédemment cloné à partir d'une autre fougère. Les méthodes de clonage des gènes *ipd79* sont décrites dans le brevet (pages 115-119). La séquence nucléotidique du gène *ipd079Ea* n'apparaît pas dans le dossier ; seule la séquence de la protéine composée de 481 acides aminés est donnée (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 23, Figure 3).

Une analyse BLAST indique que la séquence protéique IPD079Ea présente des similitudes avec de nombreuses perforines bactériennes, allant jusqu'à 39% d'identité avec la perforine de la bactérie *Methanococcus maripaludis*. En revanche, aucune homologie de séquence n'a été détectée, lors des analyses effectuées par les experts du CS, avec des perforines eucaryotes.

Par ailleurs, une analyse en gel SDS-PAGE à l'aide d'un réactif se fixant sur les glycoprotéines suggère que la protéine IPD079Ea n'est pas glycosylée (annexe PHI-2020-146 et Main text, Part II, page 86) alors que les perforines eucaryotes sont connues pour être glycosylées (Merselis *et al.*, 2021).

Ces résultats ont amené le CS à se questionner sur l'origine eucaryote ou procaryote du gène exprimé dans le maïs DP-915635-4. La connaissance de la séquence nucléotidique du gène *ipd079Ea* apparaît donc indispensable pour confirmer qu'il s'agit bien d'un gène d'origine végétale.

Spectre d'activité et mode d'action de la protéine

La protéine IPD079Ea a un spectre d'activité qui semble restreint aux insectes coléoptères, notamment aux chrysomèles *Diabrotica spp* tels que : *Diabrotica virgifera virgifera* (la chrysomèle des racines du maïs, Western CornRootworm), *Diabrotica barberi* (Northern CornRootworm) et *Diabrotica undecimpunctata* (Southern CornRootworm). Des essais biologiques réalisés avec *D. virgifera* montrent qu'on obtient 100% de mortalité des larves nourries avec un aliment contenant 50 ng de protéine IPD079Ea (Main text Part II, page 29, Table 9). Cependant, la quantité de protéine ingérée par chaque larve n'est pas indiquée, ni le stade larvaire utilisé. Le CS demande à ce que ces

éléments soient précisés dans le dossier, et que la DL50 de la protéine IPD079Ea sur les *Diabrotica* soit indiquée.

Il est indiqué dans le dossier : « The IPD079Ea protein, encoded by the *ipd079Ea* gene, confers control of certain coleopteran pests when expressed in plants by causing disruption of the midgut epithelium. »

Le CS souhaite que des données plus précises soient fournies concernant le mode d'action de la protéine IPD079Ea sur les cellules épithéliales de l'intestin des larves d'insectes sensibles. Il est en particulier important d'indiquer si cette protéine reconnaît des récepteurs spécifiques ou au contraire si elle se fixe sur des sites non spécifiques. Il est suggéré d'effectuer une analyse structurale de la protéine IPD079Ea, en se fondant sur les nombreuses données publiées sur les perforines d'origine procaryote ou eucaryote (de nouveaux logiciels performants sont disponibles, AlphaFold par exemple). Cette analyse pourrait contribuer à préciser le mode d'action de la protéine IPD079Ea.

Thermolabilité de la protéine IPD079Ea

Il est indiqué que la protéine IPD079Ea perd totalement son activité dès 50°C. Le CS suggère de compléter cette analyse en évaluant la stabilité thermique à des températures comprises entre 30 et 50°C, susceptibles d'être rencontrées dans certaines régions de culture du maïs.

Digestibilité de la protéine IPD079Ea

Le dossier indique que la protéine IPD079Ea est digérée dans un milieu à pH 1,5 en présence de pepsine. Il s'agit d'une condition extrême qui n'est pas toujours rencontrée chez l'humain ou chez l'animal. Le pH peut en effet nettement varier (de 1,5 à 6) selon l'âge de l'individu, le moment du repas, l'aliment ingéré, etc. Il serait intéressant de déterminer la digestibilité de la protéine dans ces différentes conditions.

1.2.2. Information relating to the genetically modified plant

1.2.2.2. Information on the sequences actually inserted/deleted

SbS analysis to determine copy number and confirm the absence of vector backbone sequences (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 39)

Les résultats présentés dans le dossier principal concernant des expériences de « *Next Generation Sequencing* » (NGS) et « *Southern by Sequencing* » (SbS) visant à déterminer le nombre de sites d'insertion et de copies de l'insert dans le maïs DP-915635-4 font référence à l'Annexe PHI-2020-044/040 qui est absente du dossier. Le CS souhaite que cette annexe soit communiquée⁴.

Sequencing analysis (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 42)

Il est indiqué dans le dossier principal que 24 867 pb ont été séquencées, correspondant à 2257 pb de la séquence bordure de maïs en 5', 20 564 pb de l'insert constitué de 2211 pb du plasmide PHP73878, 18190 pb du plasmide PHP83175 et 163 pb du plasmide PHP73878, et 2046 pb de la séquence bordure de maïs en 3' (Figure 3). L'analyse comparative de la séquence de 20 564 pb correspondant à l'insert et des séquences initiales, a mis en évidence qu'à l'exception d'un changement de nucléotide (remplacement A par C, pb 2931) dans le promoteur ubiZM1 issu du plasmide 73878, les séquences sont identiques.

L'Annexe PHI-2019-245 qui permet de vérifier ces données est absente du dossier communiqué au CS du HCB. Le CS souhaite que cette annexe soit communiquée⁴.

Open reading frames (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 44)

Les analyses *in silico*, utilisant la version de janvier 2020 de la base de données COMPARE pour les allergènes, ont identifié six ORFs comprenant de 59 à 289 acides aminés, présentant plus de 35% d'homologie avec des protéines allergènes. L'analyse des séquences indique qu'elles ne présentent pas les caractéristiques nécessaires à leur expression (absence de promoteur et de codon d'initiation de la traduction). Aucune homologie significative n'a été mise en évidence entre les ORFs potentielles et des toxines (consultation de bases de données internes de Pioneer et NCBI-nr).

Afin de préciser cette absence et du fait de la publication récente d'évolutions dans le domaine des prédictions de structure, le CS suggère de compléter ces analyses avec les programmes AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) et DALI <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>.

1.2.2.3. Information on the expression of the insert(s)

Multigeneration segregation analysis (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 53)

Il est indiqué dans le dossier :

« Genotypic and phenotypic analyses were conducted for five generations of DP915635 maize (F1, T2, T3, T4, and T5 generations). The genotypic analyses utilized a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay to confirm the presence or absence of the DP915635 insertion and the *ipd079Ea*, *mo-pat*, and *pmi* genes in DP915635 maize leaf samples. The phenotypic analysis utilized a visual herbicide injury evaluation to confirm the presence or absence of tolerance to glufosinate-ammonium for each individual plant. The individual results for each plant were compared to the qPCR results to verify cosegregation of genotype with phenotype ».

Si les tests de tolérance à l'herbicide glufosinate sur plantes entières effectués lors de l'étude de la descendance en ségrégation montrent une stabilité phénotypique du caractère *mo-pat*, ils ne permettent pas d'établir la stabilité phénotypique conférée par l'expression du gène *ipd079Ea*. Il est donc demandé d'effectuer des dosages de la protéine IPD079Ea par la technique ELISA au cours de cinq générations.

5. Environmental assessment

5.3.3. Interactions between the GM plant and target organisms

Il est indiqué dans le dossier que la protéine IPD079Ea possède une activité insecticide envers l'insecte cible, la chrysomèle du maïs *D. virgifera virgifera*. Lorsque ces insectes sont nourris avec un régime alimentaire contenant 50 ng de protéine IPD079Ea, une mortalité de 100 % est observée. (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 29, tableau 9). Le CS demande à ce que des scénarios d'efficacité de la protéine IPD079Ea sur les larves de *Diabrotica virgifera virgifera* soit proposés, selon les quantités ingérées par les larves.

Les concentrations de protéine produisant 50% de létalité (CL50) sont d'environ 6 ppm (soit environ 6 ng/mg de milieu nutritif) sur *D. virgifera* et *D. barberi* (brevet WO2017023486A1, pages 120-122). Comme précédemment, le CS demande à ce que la quantité de protéine ingérée par chaque insecte soit déterminée.

La question du mécanisme d'action de la protéine sur les insectes cibles n'est pas abordée. Aucune donnée n'est disponible dans le dossier du pétitionnaire, ni dans la bibliographie. Ces connaissances sont indispensables pour évaluer la possibilité d'émergence de résistance chez les insectes cibles.

5.3.4. Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

L'ingestion de la protéine IPD079Ea ne présente aucune activité insecticide sur des insectes lépidoptères tels que *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea* et *Spodoptera frugiperda* (brevet WO2017023486A1, page 122), suggérant que la protéine IPD079Ea a un spectre d'activité limité. Une analyse de liaison a également été réalisée avec la protéine IPD079Ea à l'aide de vésicules membranaires de la bordure en brosse provenant d'insectes lépidoptères. Aucune liaison n'a été observée dans toutes les conditions testées (Nelson *et al.*, 2018).

Le CS demande à ce que ces données soient complétées et que l'activité de la protéine IPD079Ea soit testée sur d'autres coléoptères (i.e. la coccinelle), sur les abeilles, mais aussi sur les poissons, poulets et autres animaux susceptibles d'être nourris avec le maïs DP-915635-4.

6. Environmental monitoring plan

Le plan de surveillance générale correspond aux exigences réglementaires de l'UE et les indications données sont conformes à la réglementation en vigueur. Le rapport annuel de surveillance, établi selon le format standard établi par la Commission européenne (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*), devra informer des volumes des importations réalisées dans chaque Etat membre. Il devra également renseigner tout échappement accidentel de graines intervenu et les mesures concrètes mises en œuvre pour y pallier (au cas par cas).

Le rapport annuel de surveillance, établi selon le format standard établi par la Commission européenne (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*), devra informer des volumes des importations réalisées dans chaque Etat membre.

Il est recommandé que la surveillance générale soit poursuivie autant que nécessaire pour permettre de prendre en compte d'éventuelles repousses associées à l'écoulement du stock de graines éventuellement en circulation dans la filière après la fin de la période d'autorisation de mise sur le marché du maïs DP915635.

On demandera au pétitionnaire de se rapprocher des Autorités compétentes en charge de la biosurveillance dans les Etats-Membres, afin d'harmoniser avec elles, et sous leur contrôle, les démarches de surveillance à réaliser.

Bibliographie

Allen, S. M., *et al.* (2018) Plant derived insecticidal proteins and methods for their use. US Patent App. 15/750,520, 2018

Devos Y, Ortiz-Garcia S, Hokanson KE and Raybould A (2018) Teosinte and maize/teosinte hybrid plants in Europe-Environmental risk assessment and management implications for genetically modified maize. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 259, 19-27.

Díaz A, Taberner A, Vilaplana L (2020) The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 67, 225–239.

EC (2003). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* L268, 1-23.

EFSA (2013). EFSA guidance on the submission of applications for authorisation of genetically modified plants under Regulation (EC) No 1829/2003. *EFSA Journal* 11(12):3491, 21 pp.

EU (2013). Commission Implementing Regulation (EU) No 503/2013 of 3 April 2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulations (EC) No 641/2004 and (EC) No 1981/2006. *Official Journal of the European Union* L157, 1-48.

EFSA, 2016a. Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. *EFSA Supporting Publications* 13, EN-1094. [10.2903/sp.efsa.2016.EN-1094](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1094)

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. *et al.* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

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

Lohn AF, Trtikova M, Chapela I, Binimelis R, Hilbeck A (2021) Transgene behavior in genetically modified teosinte hybrid plants: transcriptome expression, insecticidal protein production and bioactivity against a target insect pest. *Environmental Sciences Europe* 33:67.

Merselis LC, Rivas ZP, Munson GP (2021) Breaching the Bacterial Envelope: The Pivotal Role of Perforin-2 (MPEG1) Within Phagocytes. *Front. Immunol.* 12:597951. doi: [10.3389/fimmu.2021.597951](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.597951)

Nelson *et al.* (2018) A plant-derived protein with insecticidal activity against Western Corn RootwormSIP 2018, *Proceedings abstracts*, #137, page 120.

Annexe 1 : Saisine



REÇU LE

23 JUIN 2021
A 2021-553

Direction générale
de l'alimentation

Paris, le

22 JUIN 2021

Dossier suivi par : Anne GREVET

Service des actions sanitaires
Sous-direction de la santé et de la protection des
végétaux
Bureau des semences et des solutions alternatives
Tél. : 01 49 55 58 25
Mél. : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Monsieur Jean-Christophe PAGES
Président du Haut Conseil des biotechnologies par
intérim
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

Objet : saisine du Haut Conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Réf. : saisine HCB – dossier 2020-172

Monsieur le Président,

Dans le cadre du règlement 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'EFSA, le dossier est mis à disposition des États membres qui disposent de 3 mois pour faire des commentaires.

Le dossier suivant a été déclaré valide par l'EFSA et est soumis à consultation des États membres :

- dossier **EFSA-GMO-NL-2020-172**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié DP-915635-4 pour l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'EFSA jusqu'au 13 septembre 2021.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de proposer des commentaires à transmettre à l'EFSA au plus tard le **7 septembre 2021**.

J'appelle votre attention sur le fait que le dossier contient des informations que le pétitionnaire souhaite maintenir confidentielles.

Je vous prie de croire, Monsieur le Président, à l'assurance de ma considération distinguée.

La sous-directrice de la santé
et de la protection des végétaux

Anne-Cécile COTILLON

251, rue de Vaugirard, 75732 Paris Cedex 15
agriculture.gouv.fr

1/1

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise et d'un projet d'avis en séance du 26 août 2021⁹ sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès et la vice-présidence du Dr Claudine Franche.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Barbara Demeneix (démissionnaire), Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer (démissionnaire), Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuill, Jean-Luc Vilotte¹⁰.

Le dossier a été examiné par quatre experts rapporteurs sélectionnés pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier : trois membres du CS du HCB et une experte externe, Géraldine Dubreuil de l'Université de Tours.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

L'experte externe a rempli une déclaration publique d'intérêts et a certifié n'avoir aucun conflit d'intérêts avec le dossier concerné. Elle a fourni une analyse du dossier dans son domaine d'expertise. Elle n'a toutefois pas contribué directement à la rédaction de cet avis, qui reste de la responsabilité du CS du HCB.

⁹ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 26 août 2021 : Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

¹⁰ Composition en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014, à la loi du 2 décembre 2015 et à l'arrêté du 10 avril 2017 portant nomination des membres du HCB, publié le 28 avril 2017 et au décret n°2019-1353 du 12 décembre 2019 puis au décret n°2020-1675 du 23 décembre 2020 prolongeant le mandat des membres du HCB.

Annexe 3 : Commentaires traduits en anglais à destination de l'EFSA

Cette annexe est une compilation des commentaires du HCB sur le dossier EFSA-GMO-NL-2020-172 traduits en anglais à destination de l'EFSA, prêts à être postés en ligne de manière indépendante par section dans les formulaires du site de l'EFSA.

A3.1. General comments

Preliminary remark

Two assessment bodies were asked to study this application in France: the High Council for Biotechnology (HCB), receiving a referral from the Ministry for Agriculture, the Food Processing Industry and Forestry (MAAF), and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), receiving a referral from the Ministry for the Economy, Industry and Digital Affairs (MEIN). Comments on the application's environmental risk assessment are sent by HCB through MAAF, and comments on its health risk assessment are sent by ANSES through MEIN. The two sets of comments are complementary.

Main comments

1. Regarding the molecular characterisation

Two important Annexes listed in the application EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, which are necessary for an accurate evaluation of the molecular characterisation, are missing from the application: 1) Annex PHI-2019-245 which presents the results of the sequencing of the insert; 2) Annex PHI-2020-044/040 describing in detail the number of insertion sites and transgene copies. It is essential that these annexes are included in the application¹¹.

The amino acid sequence of the IPD079Ea protein is provided in the application EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, but due to the absence of Annex PHI-2019-245, the nucleotide sequence of the ipd079Ea gene is not accessible in the submitted documents, hence the HCB Scientific Committee cannot provide any analysis. Furthermore, in the absence of the annexes, the analyses carried out on the protein sequence lead the Scientific Committee to question the certainty of the origin of the gene expressed in maize DP-915635-4. In particular, due to strong similarities with bacterial perforins, the HCB Scientific Committee cannot confirm a plant origin.

The HCB Scientific Committee notes the lack of important data on the mode of action of the IPD079Ea protein. The effects on the epithelial cells of the gut of susceptible insect larvae are not described. It is not stated whether this protein recognises specific receptor(s) or binds to non-specific receptors.

The application contains limited information on the first step of genetic transformation, which leads to the insertion of the protein into a predefined site of the maize genome. In particular, nothing is reported about the carrier sequence of the specific integration site of the transgenes.

¹¹ Supplementary information was received after the discussion of the dossier by the HCB Scientific Committee. It was submitted to EFSA by the petitioner on 01 September 2021 and communicated to the HCB on 06 September 2021. This information could provide answers to the questions raised by the Scientific Committee. It has not been taken into account due to its late transmission.

The choice of the insertion site is not argued. Also, the study of a possibility of off-target modifications resulting from the CRISPR-Cas9 strategy is not mentioned in the application.

The HCB Scientific Committee notes that the phenotypic stability of resistance to *Diabrotica virgifera virgifera* conferred by the expression of the *ipd079Ea* gene is not established by the data contained in the application. This point could be clarified by assays of the IPD079Ea protein by the ELISA technique, over five generations.

2. Regarding the environmental risk assessment

The HCB Scientific Committee requests that the sections dealing with target and non-target organisms be completed. For target organisms, data on the range of IPD079Ea protein concentrations ingested by target insect larvae should be determined. Optimally, the LD50 of the IPD079Ea protein on *Diabrotica* larvae should be determined. The mechanism of action of the protein should be clarified in order to assess the emergence of possible resistance. A more complete evaluation of the insecticidal spectrum of action of the IPD079Ea protein should also be provided, especially on other coleopteran insects such as ladybirds.

The application only refers to importation into the temperate regions of the EU. However, the EU also includes outermost regions located in tropical zones that are more conducive to the persistence of maize. This is the case for certain French overseas departments and regions. The HCB Scientific Committee would like the particular environmental characteristics of these regions to be taken into account in the risk assessment and monitoring plans for applications on the marketing of seeds from genetically modified plants in the European Union. An alternative would be to exclude these particular geographical areas from the scope of the marketing authorisation.

The HCB Scientific Committee notes that the application does not take into account the presence of teosinte populations in the EU that are sexually compatible with the cultivated maize and the risk associated with the possibility of gene transfer from DP-915635-4 to teosinte. The certainty of teosinte presence has been established for several years, so this risk should be considered.

3. Regarding the monitoring reports and the post-market monitoring plan

The general monitoring plan is in line with EU regulatory requirements.

The petitioner has taken into account the need for appropriate measures to ensure that accidental release does not occur or is limited, knowing that possible mechanical or chemical treatments other than glufosinate-based herbicides (banned in France) are provided to treat them.

The HCB Scientific Committee nevertheless asks the petitioner to approach the authorities in charge of biomonitoring in the Member States, in order to harmonise with them and under their control the monitoring measures to be implemented. The monitoring measures should be adapted to the specific context of each Member State, taking into account the regions where teosinte populations have been reported.

The HCB Scientific Committee recalled that the annual report should provide information on the volumes of imports into each Member State. It should be drawn up according to the standard format established by the European Commission (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*).

Finally, it is advised that general surveillance should continue as long as necessary to allow for possible regrowth associated with the disposal of any seed stock circulating in the industry after the end of the marketing authorisation period for maize DP-915635-4.

Additional comments

The HCB Scientific Committee points out that the European Union has ratified the Convention on Biological Diversity, which states that both exporting and importing countries have international responsibilities with regard to biological diversity.

In this context, some members of the HCB Scientific Committee stress the importance of taking into account in the decisional process of the impact of the cultivation of maize DP-915635-4 in exporting countries on biodiversity. With this in view and considering that there is a connection between biological diversity in importing and exporting countries, they would like the application to include existing data on the impact of the cultivation of this crop on the biodiversity of producing and exporting countries.

Furthermore, they recommend that the regulator consider in its decisions the influence of the import of certain products, whether transgenic or not, on the choice of crops usage by growers in Europe, and the impact on the biodiversity resulting from the associated agrosystems.

Some members of the HCB Scientific Committee also raise the ethical question of authorising the import into the European Union of a product whose production in the exporting countries will involve the exposure of operators to plant protection product based on glufosinate ammonium, which has been withdrawn from the French market for health reasons.

A3.2. Comments per section

1. Hazard identification and characterisation

1.1 Information relating to the recipient or (where appropriate) parental plants

ii) Sexual compatibility with other cultivated or wild plant species (EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 11)

The analysis of the risks of dispersal by gene flow with related species is insufficient as it does not consider the presence of teosinte populations in France and Spain. Two publications (Devos *et al.* 2018; EFSA, 2016a) are cited in the application, but the factual elements they contain are not included in the analysis, or even questioned.

The HCB Scientific Committee points out that there are recent publications highlighting the presence of hybrids and/or gene flow between cultivated maize and European teosinte (Diaz *et al.*, 2020; Le Corre *et al.*, 2020; Lohn *et al.*, 2021). These publications should be cited in the application.

1.2 Molecular Characterisation

1.2.1. Information relating to the genetic modification

1.2.1.1. Description of the methods used for the genetic modification

Event development process for DP915635 maize (EFSA-GMO-NL-2020-172 CC3, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 53)

The methodology followed to obtain DP915635 maize is described very briefly:

'DP915635 maize was developed by site-specific integration (SSI; Anand *et al.*, 2019) using two sequential transformation steps to (1) insert an integration site sequence (referred to as a "landing pad" sequence) at a specific location of the maize genome using microprojectile bombardment and a clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9 (CRISPR-Cas9)-mediated targeted insertion process, and (2) insert, via recombination, the intended expression cassettes

from the plasmid PHP83175 T-DNA region into the landing pad in the maize genome using *Agrobacterium*-mediated transformation, using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404.'

While Appendix B6 of the application provides a detailed description of the five plasmids used to obtain the maize, the HCB Scientific Committee would have liked:

- the rationale for choice of the insertion zone in the maize genome by the guide RNA to be exposed;
- the possibility of off-target modifications resulting from the CRISPR-Cas9 strategy to be addressed, at least through *in silico* studies;
- the experiments conducted to carry out the molecular characterisation of the transgenic maize obtained after the first stage of genetic transformation to be presented in the application.

The HCB Scientific Committee also questioned the nature of the explants chosen for the second stage of genetic transformation.

1.2.1.3. Source of donor nucleic acid(s) used for transformation, size, and intended function of each constituent fragment of the region intended for insertion

***Ophioglossum pendulum* : donor of the *ipd079Ea* gene** (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 16)

Safety of the IPD079E protein

The origin of the *ipd079Ea* gene, the fern *O. pendulum*, is presented as a guarantee of the safety of the protein for humans and livestock (Main text Part II, 1.2.1.3., page 38). There is no evidence that the IPD079Ea protein is produced in sufficient quantities by the plant to have a toxic effect on humans or livestock. Furthermore, there is no evidence that the fern is actually ingested by these mammals.

The HCB Scientific Committee considers that this argument regarding the safety of the IPD079Ea protein is not sufficiently argued to be acceptable.

Sequence analysis of the IPD079E protein

IPD079Ea is a protein of approximately 52 kDa whose gene was cloned from the fern *Ophioglossum pendulum*. Patent WO2017023486A1 states that the *ipd079Ea* gene 'was amplified from cDNA prepared from the total RNA from *Ophioglossum pendulum* using forward primer of SEQ ID NO: 1251 and reverse primer of SEQ ID NO: 1252. The resulting PCR product was subcloned...'. In fact, the *ipd079Ea* gene was cloned by homology with the *ipd079Aa* gene previously cloned from another fern. The methods for cloning the *ipd79* genes are described in the patent (pages 115-119). The nucleotide sequence of the *ipd079Ea* gene does not appear in the application; only the sequence of the protein consisting of 481 amino acids is given (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 23, Figure 3).

BLAST analysis indicates that the IPD079Ea protein sequence shows similarities to many bacterial perforins, with up to 39% identity to the perforin from the bacterium *Methanococcus maripaludis*. However, no sequence homology was detected with eukaryotic perforins in the analyses performed by the HCB Scientific Committee experts.

Furthermore, SDS-PAGE analysis using a glycoprotein-binding reagent suggests that the IPD079Ea protein is not glycosylated (Appendix PHI-2020-146 and Main text, Part II, page 86) whereas eukaryotic perforins are known to be glycosylated (Merselis *et al.*, 2021).

These results led the HCB Scientific Committee to question the eukaryotic or prokaryotic origin of the gene expressed in maize DP-915635-4. Knowledge of the nucleotide sequence of the *ipd079Ea* gene therefore appears essential to confirm that it is indeed a gene of plant origin.

Activity spectrum and mode of action of the protein

The IPD079Ea protein has a spectrum of activity that seems to be restricted to coleopteran insects, in particular to *Diabrotica* spp. such as *Diabrotica virgifera virgifera* (the corn rootworm, Western CornRootworm), *Diabrotica barberi* (Northern CornRootworm) and *Diabrotica undecimpunctata* (Southern CornRootworm). Bioassays with *D. virgifera* show that 100% mortality of larvae fed with a diet containing 50 ng of IPD079Ea protein is achieved (Main text Part II, page 29, Table 9). However, the amount of protein ingested by each larva is not indicated, nor the larval stage used. The HCB Scientific Committee requests that these elements be specified in the application, and that the LD50 of the IPD079Ea protein on *Diabrotica* be indicated.

The application states: 'The IPD079Ea protein, encoded by the *ipd079Ea* gene, confers control of certain coleopteran pests when expressed in plants by causing disruption of the midgut epithelium.'

The HCB Scientific Committee would like to see data that are more precise on the mode of action of the IPD079Ea protein on the gut epithelial cells of susceptible insect larvae. In particular, it is important to indicate whether this protein recognises specific receptors or binds to non-specific sites. A structural analysis of the IPD079Ea protein could be carried out, based on the numerous published data on perforins of prokaryotic or eukaryotic origin (new high-performance software, such as AlphaFold, are available). This analysis could help to clarify the mode of action of the IPD079Ea protein.

Thermolability of the IPD079Ea protein

It is stated that the IPD079Ea protein loses its activity completely at 50°C. The HCB Scientific Committee suggests that the thermal stability analysis be supplemented with data at temperatures between 30 and 50°C, likely to be encountered in certain maize growing regions.

Digestibility of the IPD079Ea protein

The application states that the IPD079Ea protein is digested in a pH 1.5 medium in the presence of pepsin. This is an extreme condition which is not always encountered in humans or animals. The pH can indeed vary considerably (from 1.5 to 6) depending on the age of the individual, the time of the meal, the food ingested, etc. It would be interesting to determine the digestibility of the protein under these different conditions.

1.2.2 Information relating to the genetically modified plant

1.2.2.2 Information on the sequences actually inserted/deleted

SbS analysis to determine copy number and confirm the absence of vector backbone sequences (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 39)

The results presented in the application regarding Next Generation Sequencing (NGS) and Southern by Sequencing (SbS) experiments to determine the number of insertion sites and copies of the insert in maize DP-915635-4 refer to the Annex PHI-2020-044/040 which is missing from the application. The HCB Scientific Committee would like this annex to be provided¹¹.

Sequencing analysis (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 42)

It is stated in the application that 24,867 bp were sequenced, corresponding to 2257 bp of the 5' maize border sequence, 20,564 bp of the insert consisting of 2211 bp of plasmid PHP73878, 18190 bp of plasmid PHP83175 and 163 bp of plasmid PHP73878, and 2046 bp of the 3' maize border sequence (Figure 3). Comparative analysis of the 20,564 bp insert sequence and the original sequences revealed that - with the exception of a nucleotide change (replacement of A by C, bp 2931) in the ubiZM1 promoter from plasmid 73878 - the sequences are identical.

The Annex PHI-2019-245 which allows to verify these data is missing from the file communicated to the HCB Scientific Committee. The HCB Scientific Committee would like this annex to be provided¹¹.

Open reading frames (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 44)

In silico analyses, using the January 2020 version of the COMPARE database for allergens, identified six ORFs ranging from 59 to 289 amino acids, with more than 35% homology to allergenic proteins. Sequence analysis indicated that they lacked the necessary characteristics for expression (lack of promoter and translation initiation codon). No significant homology was found between the potential ORFs and toxins (consultation of Pioneer and NCBI-nr internal databases).

In order to clarify this absence and due to the recent publication of developments in the field of structure prediction, the HCB Scientific Committee suggests completing these analyses with the DALI programme (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>).

1.2.2.3 Information on the expression of the insert(s)

Multigeneration segregation analysis (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 53)

The application states:

‘Genotypic and phenotypic analyses were conducted for five generations of DP915635 maize (F1, T2, T3, T4, and T5 generations). The genotypic analyses utilized a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay to confirm the presence or absence of the DP915635 insertion and the *ipd079Ea*, *mo-pat*, and *pmi* genes in DP915635 maize leaf samples. The phenotypic analysis utilized a visual herbicide injury evaluation to confirm the presence or absence of tolerance to glufosinate-ammonium for each individual plant. The individual results for each plant were compared to the qPCR results to verify cosegregation of genotype with phenotype.’

While the whole-plant glufosinate herbicide tolerance tests performed during the Multigeneration segregation analysis show phenotypic stability of the *mo-pat* trait, they do not establish the phenotypic stability conferred by expression of the *ipd079Ea* gene. It is therefore requested that IPD079Ea protein assays be performed by the ELISA technique in five generations.

5. Environmental assessment

5.3.3. Interactions between the GM plant and target organisms

It is stated in the dossier that the IPD079Ea protein has insecticidal activity towards the target insect, the corn rootworm *D. virgifera virgifera*. When these insects were fed a diet containing 50

ng of IPD079Ea protein, 100% mortality was observed. (EFSA-GMO-NL-2020-172, Part II Scientific information, Main text DP915635, p. 29, table 9). The HCB Scientific Committee requests that efficacy scenarios of the IPD079Ea protein on *Diabrotica virgifera virgifera* larvae be proposed, depending on the amount ingested by the larvae.

Protein concentrations producing 50% lethality (LC50) are about 6 ppm (i.e. about 6 ng/mg nutrient medium) on *D. virgifera* and *D. barberi* (patent WO2017023486A1, pages 120-122). As before, the HCB Scientific Committee requires that a range of protein amount ingested by each larva be determined.

The mechanism of action of the protein on the target insects is not addressed. No data is provided in the petitioner's file, nor in the bibliography. This knowledge is essential to evaluate the possibility of resistance emergence in the target insects.

5.3.4 Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

Ingestion of the IPD079Ea protein does not show any insecticidal activity on lepidopteran insects such as *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (patent WO2017023486A1, page 122), suggesting that the IPD079Ea protein has a limited spectrum of activity. A binding assay was also performed with IPD079Ea using brush border membrane vesicles from lepidopteran insects. No binding was observed under all conditions tested (Nelson *et al.*, 2018).

The HCB Scientific Committee requests that these data be completed and that the activity of the IPD079Ea protein be tested on other beetles (*i.e.* ladybird), on bees, but also on fish, chickens and other animals that may be fed with DP-915635-4 maize.

6. Environmental monitoring plan

The general monitoring plan is in line with EU regulatory requirements and the information given is in accordance with the regulations in force. The annual monitoring report, drawn up according to the standard format established by the European Commission (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*), will have to provide information on the volumes of imports into each Member State. It must also provide information on any accidental escape of seeds and the concrete measures implemented to remedy this (on a case-by-case basis).

The annual monitoring report, drawn up according to the standard format established by the European Commission (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*), should provide information on the volume of imports into each Member State.

It is recommended that general surveillance be continued as long as necessary to allow for possible regrowth associated with the disposal of any seed stock in the pipeline after the end of the marketing authorization period for maize DP-915635-4.

The petitioner will be asked to contact the competent authorities in charge of biomonitoring in the Member States, in order to harmonize with them, and under their control, the monitoring procedures to be carried out.