



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Maisons-Alfort, le 15 octobre 2008

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un soja génétiquement modifié A5547-127, tolérant au glufosinate- ammonium, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 25 juillet 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relative à la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un soja génétiquement modifié A5547-127, tolérant au glufosinate-ammonium, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-NL-2008-52).

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) 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'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'AFSSA.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 10 octobre 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

#### (A) Information générale

Le soja est une culture des zones chaudes à semi-tropicales. C'est une légumineuse peu envahissante et difficile à désherber, par binage, qui se défend mal des graminées et de certaines plantes à graines toxiques (*Datura ferox*) qui ont souvent contaminé les graines de soja. Il existe peu d'herbicides spécifiques sans effet sur les légumineuses, ce qui a fait très largement adopter par les cultivateurs la plante génétiquement modifiée résistante à un herbicide total.

La graine de soja est très peu utilisée à l'état cru en raison notamment de la présence de facteurs antinutritionnels (notamment l'acide phytique qui séquestre le phosphore, les facteurs antitrypsiques qui perturbent la digestibilité des protéines chez les animaux monogastriques et chez l'homme ou les lectines qui ont une activité hémagglutinante). Les produits destinés à l'alimentation animale sont la graine toastée ou le tourteau déshuilé toasté. Les produits destinés à l'alimentation humaine sont très divers, notamment la farine, les protéines (isolats et concentrats), l'huile, la margarine et les lécithines utilisées comme émulsifiants dans de nombreux produits alimentaires.

Le soja A5547-127 est rendu tolérant à un herbicide, le L-glufosinate-ammonium par l'introduction du gène *pat*, isolé d'un microorganisme du sol : *Streptomyces viridochromogenes*, codant une protéine enzymatique PAT, la phosphinothricine acétyl-transférase, qui métabolise le L-glufosinate-ammonium en un dérivé acétylé non phytotoxique.

Un soja génétiquement modifié, portant le même gène (LibertyLink A2704-12) a déjà fait l'objet d'une évaluation et d'un avis en 2006. Le soja A5547-127 est issu de la transformation de la variété A5547, adapté à d'autre région géographique que le soja A2704.

**(C) Informations relatives à la modification génétique**

- (1) Des apex de pousses provenant de semences stérilisées cultivées *in vitro* ont été transformés en bombardant ces tissus avec le plasmide pB2/35Sack, dérivé du vecteur pUC19.
- (2) Préalablement à la transformation, le vecteur pB2/35Sack de 4076 pb a été soumis à une restriction par l'enzyme *PvuI* afin de couper en deux le gène de résistance bactérienne à l'ampicilline (*bla*) et de le rendre non-fonctionnel. Cette restriction génère donc deux fragments d'ADN :
- un fragment de 3119 pb constitué de la cassette d'expression du gène d'intérêt *pat*, de l'origine de réplication bactérienne et de la moitié 3' du gène *bla*,
  - un fragment de 957 pb constitué de la moitié 5' du gène *bla*, d'un morceau de pUC19 et d'une bordure droite d'un plasmide Ti.

**(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée**

- (2) Des analyses par Southern blot, PCR et séquençage montrent que l'insertion a eu lieu en un seul locus, et que le transgène inséré correspond à l'insertion tronquée des deux fragments de restriction *PvuI*.

L'analyse des séquences de l'insert (3436 pb) montre qu'il comprend:

- une bordure droite provenant du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*,
- une séquence de 391 pb de la partie 5' (base 29 à 419 de la région codante, n'incluant pas l'ATG) du gène *bla* en orientation inverse,
- une copie de la cassette d'expression comprenant un gène synthétique *pat* fusionné au promoteur et au terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur,
- de l'ADN plasmidique comprenant l'origine de réplication bactérienne *ori*,
- une séquence de 423 pb correspondant à l'extrémité 3' du gène *bla* (base 438 à 861 de la région codante).

La séquence de la cassette d'expression *pat* jusqu'à la région 3' *bla* incluse, contenue dans l'évènement A5547-127, est identique à celle du plasmide de départ. Une délétion de 72 pb dans la région 5' du gène *bla* (dont 28 pb de la région codante *bla* comprenant l'ATG) a été observée. Par conséquent, les deux séquences partielles du gène *bla* ne constitue pas un gène *bla* intact. Des analyses de type northern ont permis de vérifier que le gène *bla* ne s'exprime pas dans les feuilles, les tiges, les racines et les graines.

La séquence des régions du génome adjacentes à l'insertion a été comparée à celle de la lignée parentale de soja, A5547. Aucune insertion ni délétion autour du site d'intégration du transgène n'a été observée. Une analyse bioinformatique montre qu'au lieu de l'insertion, la séquence présente une homologie avec l'ADN génomique de *Glycine max*, et avec des ADNc putatifs pour lesquels aucune fonction n'est connue.

La recherche de nouvelles phases ouvertes de lecture (ORF), et d'éléments de régulation de l'expression a été effectuée aux niveaux des jonctions 5' et 3' de l'insertion ainsi qu'au niveau de la jonction interne de l'insert créée par l'association des deux fragments de restriction du plasmide.

Ainsi, huit ORF potentielles ont été identifiées et seule une ORF possède tous les éléments requis pour une expression. Aucune de ces huit ORFs putatives ne présente d'homologie de séquence avec celles des toxines ou des allergènes répertoriés dans les banques de données.

**(3) Informations relatives à l'expression des produits du transgène**

Les teneurs en protéine PAT ont été mesurées par la méthode ELISA dans les feuilles, les tiges et les racines de sojas portant l'évènement A5547-127 cultivés en serre et traités au glufosinate-ammonium, prélevés aux stades végétatifs V3 et V8. L'expression la plus forte est mesurée dans la tige au stade V3 (39 µg/g de poids frais, 0.84% de protéines totales). Dans les feuilles, la teneur la plus élevée est observée au stade V8 (26 µg/g de poids frais) et le pourcentage de PAT par rapport aux protéines totales augmente fortement entre V3 et V8 (de 0,22 à 0,73 %).

Les teneurs en protéine PAT ont aussi été mesurées par la méthode ELISA dans les graines de plantes de soja A5547-127, traitées ou non traitées au glufosinate-ammonium, cultivées en plein champs aux Etats-Unis en 1999. Les données montrent que la teneur en protéine PAT dans le grain est très faible (de l'ordre de 0.02 µg/g de poids frais) et que le traitement au glufosinate-ammonium ne modifie pas cette teneur.

(5) **Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité de son expression**

La stabilité de l'insertion portant le gène de tolérance au glufosinate-ammonium a été vérifiée sur 3 générations de backcross et croisements par des analyses de type Southern-blot ainsi que par l'étude de la ségrégation du caractère d'intérêt agronomique. Le caractère de résistance au glufosinate-ammonium porté par le locus *pat* se comporte comme un caractère unique et dominant qui suit la loi de ségrégation mendélienne.

(7) **Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**

(7.1-3) L'analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons de sojas génétiquement modifiés A5547-127, traités et non traités au glufosinate-ammonium, et de la variété de soja d'origine A5547. Les sojas sont cultivés conjointement en 1999 sur 4 sites, en 2000 sur 5 sites et en 2006 sur 7 sites aux Etats-Unis (avec 3 répétitions par site).

L'analyse de composition a été réalisée sur la graine crue, les macro-éléments (protéines, lipides, hydrates de carbone, eau, cendres, ADF, NDF) ainsi que 6 minéraux, 4 vitamines (B1, B2, B9, E), 18 acides aminés, 13 acides gras, 5 facteurs anti-nutritionnels et 3 isoflavones ont été considérés dans l'étude.

L'analyse statistique (analyse de variance) a consisté à comparer les données issues du soja témoin non traité au soja génétiquement modifié A5547-127 non traité et celles issues du soja témoin non traité au soja GM A5547-127 traité au glufosinate-ammonium. Cette analyse a été réalisée site par site en comptabilisant le nombre de site où la différence est statistiquement significative d'une part et tous sites et années confondus, d'autre part. Les moyennes tous sites et années confondus ont été comparées aux valeurs de références publiées dans la littérature

Les résultats de l'analyse statistique ne montrent aucune différence de concentration sur la plupart des composés mesurés entre les sojas témoins et génétiquement modifiés GM. Les valeurs moyennes tous sites confondus sont situées dans la plage de fluctuation des valeurs de référence. Notons que le raffinose (facteur antinutritionnel) présente une teneur plus faible dans les sojas GM par rapport aux sojas témoins pour 50% des sites de cultures.

Les teneurs en isoflavone (daïdzéine, génistéine, glycitéine) varient considérablement suivant la méthode utilisée pour les mesurer. Toutefois, elles ne diffèrent pas entre les graines issues de sojas témoins et génétiquement modifiés et ne sont pas non plus affectées par le traitement au glufosinate-ammonium.

Une analyse de composition a été réalisée sur des produits dérivés issus du traitement technologique de graines provenant de sojas cultivés dans l'Arkansas en 2006. La comparaison a porté sur les macro-éléments des coques et des tourteaux non toastés, sur les acides aminés des isolats protéiques, sur les facteurs anti-nutritionnels des tourteaux (toastés et non toastés), sur les acides gras de l'huile raffinée et sur les phospholipides de la lécithine.

Comme attendu, l'ensemble des procédés de traitement appliqués au soja, en particulier, le chauffage à température supérieure à 100 °C diminue fortement l'activité des facteurs anti-nutritionnels. L'efficacité du traitement thermique étant variable sur ce paramètre, des différences sont observées concernant les teneurs en inhibiteur trypsique et en lectine dont les teneurs sont plus élevées dans les tourteaux toastés provenant des sojas non transgéniques. Aucune différence n'est observée entre les composés des produits

dérivés issus de sojas témoin et ceux issus de sojas génétiquement modifiés.

(7.6) **Effets des traitements technologiques**

Les dosages de la protéine PAT réalisés par la technique ELISA dans les produits dérivés montrent qu'en raison de sa sensibilité thermique, la protéine PAT y est présente à très faible teneur (tableau 1).

**Tableau 1:** Teneur en protéine PAT (exprimée en ng/g de poids frais) dans les produits dérivés issus de la graine de sojas A5547-127

Produits dérivés	Protéine PAT (ng/g poids frais)	Protéine PAT en % de protéines totales
coque	9521	0,00339
tourteau	69.5	0,000012
tourteau toasté	13.4	
isolat de protéines	80.9	
huile raffinée	non détecté	
lecithine brute	non détecté	

(7.7) **Utilisation et consommation prévue**

La consommation de protéine PAT chez l'homme est calculée sur la base de données de consommation de produits dérivés de soja en Europe enregistrés par l'OMS (FAO/WHO database).

Ces estimations de consommation sont maximisées dans le sens où l'on considère que la totalité des produits dérivés consommés proviendrait du soja A5547. Sur la base d'une quantité moyenne de 10 µg/g de protéine PAT dans les graines de soja, la consommation maximale calculée pour l'Homme est de 31.3 µg/personne et par jour.

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) L'organisme donneur est *Streptomyces viridochromogenes*, une bactérie non pathogène du sol présente à l'état naturel dans l'environnement de l'homme.

La sécurité de protéines de type PAT a déjà été évaluée à plusieurs reprises puisque PAT est exprimée dans différentes plantes génétiquement modifiées précédemment autorisées.

De plus, les éléments suivants ont été démontrés :

- l'action de la protéine PAT est très spécifique de son substrat L-phosphinothricine et elle n'acétyle pas d'autres L-acides aminés,
- la protéine PAT codée par le gène *pat* est très similaire (structure secondaire, immuno-réactivité, poids moléculaire et activité enzymatique) aux acétyl-phosphotransférases présentent dans l'environnement et l'alimentation humaine et animale,
- la protéine PAT ne présente pas d'homologie de structure avec des protéines répertoriées dans les banques de données, connues pour être toxiques, immunotoxiques ou avoir une activité pharmacologique,
- la protéine PAT perd toute activité enzymatique après chauffage à 50° C mais conserve sa structure après 60 minutes à 90 °C,
- la protéine PAT est dégradée en moins de 30 secondes *in vitro* en milieu gastrique simulé (en présence de pepsine, à pH 2) et en fluide intestinal simulé (en présence de pancréatine à pH 7,5),

Une étude de toxicité aiguë, réalisée chez des souris à qui une dose unique de la protéine PAT (10 mg/kg p.c.) a été administrée par voie intraveineuse, n'a pas mis en évidence d'effets néfastes ni de mortalité après 15 jours d'observation.

Cette même protéine a fait l'objet d'une seconde étude via l'aliment, par administration répétée, pendant 14 jours consécutifs, à 2 groupes de rats aux doses journalières de 0,71 et de 7,6 g/kg p.c. chez le mâle et de 0,7 et de 7,96 g/kg p.c. chez la femelle. Aucun effet

lié au traitement ayant une signification toxicologique n'a été observé par rapport au groupe d'animaux soumis à un régime dont la teneur en protéine est équivalente.

L'équivalence entre la protéine PAT produite par *E. coli* utilisée pour les essais sur les rongeurs (toxicité aiguë et réitérée) avec la protéine exprimée dans la plante a été démontrée.

**(7.8.4) Etude de la toxicité sub-chronique**

Etant donné la particularité du soja, connu pour contenir de nombreux facteurs antinutritionnels, il serait nécessaire de disposer d'une étude de toxicité sub-chronique (90 jours) chez le rat nourri avec des produits issus du soja A5547-127 pour exclure la survenue d'effets toxiques inattendus liés à la modification génétique.

**(7.9) Allergénicité**

L'évaluation de l'allergénicité repose sur les éléments suivants :

- l'organisme donneur de la protéine PAT n'est pas connu pour être à l'origine d'allergènes ;
- la comparaison de la séquence des acides aminés (sur la base de recherche d'identité de séquences protéiques portant sur 8 acides aminés consécutifs) de la protéine PAT exprimée dans le soja A5547-127 avec des séquences de protéines connues pour être allergènes et répertoriées dans les bases de données ne permet pas d'identifier de telles identités ;
- la digestion rapide *in vitro* de ces protéines en milieu gastrique ou intestinal simulé ;
- l'absence de site de N-glycosylation (recherche *in silico*)
- l'inactivation thermique de PAT
- la faible teneur de PAT dans les produits destinés à la consommation
- les résultats d'une étude utilisant des sérums de patients présentant une allergie au soja vérifie que la modification génétique introduite n'induit pas de modification du contenu en allergène du soja portant l'événement A5547-127 par rapport au soja témoin non transformé.

Il convient de noter que ces données ne suffisent pas, pour autant, à conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.

**(7.10) Evaluation nutritionnelle**

Une étude d'alimentarité a été réalisée en 1998 chez le poulet (120 animaux par traitement, 6 répétitions de 20 animaux) nourri pendant 42 jours avec un régime contenant 20 % de graine de soja toastée. Les graines sont issues soit de soja GM portant l'événement A5547-127, soit de soja témoin A5547. Les poulets reçoivent 3 régimes successifs correspondant aux périodes de démarrage, croissance et finition.

Les données de composition chimique des régimes et des graines toastés utilisés dans l'étude ne sont pas fournies.

On n'observe aucune différence entre les animaux ayant reçu le soja témoin et le soja GM pour ce qui concerne les performances zootechniques, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux (inférieur à 1%) et 5 paramètres de découpe (poids du tissu adipeux abdominal, poids des muscles pectoraux et *supracoracoïdeus*).

### **Conclusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments**

La caractérisation moléculaire de l'insertion présente dans les sojas portant l'événement A5547-127 est complète.

L'analyse de composition des graines et des produits dérivés permet de conclure à l'équivalence en substance entre les graines de soja A5547-127 et leurs produits dérivés et les graines de soja témoin et leurs produits dérivés.

L'étude d'alimentarité réalisée chez les poulets pendant 42 jours ne met pas en évidence de différence nutritionnelle entre les graines toastées de sojas portant l'événement A5547-127 et les graines toastées de soja témoin.

Toutefois, une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat nourri avec un produit dérivé de soja A5547-127 traité et non traité par le glufosinate-ammonium serait nécessaire pour compléter l'évaluation toxicologique de ce soja. En son absence, l'Agence française de sécurité des aliments ne peut se prononcer sur la sécurité sanitaire des sojas portant l'événement de transformation A5547-127.

**Mots clés** : OGM, soja, tolérance au glufosinate-ammonium, *pat*

**La Directrice Générale**

**Pascale BRIAND**