

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 juillet 2013

AVIS

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

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement CE n° 1829/2003 du soja génétiquement modifié DAS-44406-6, développé pour être tolérant à certains herbicides, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM.

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 25 avril 2013 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), d'une demande d'avis concernant l'autorisation de mise sur le marché au titre du règlement (CE) n°1829/2003 du soja génétiquement modifié DAS-44406-6, développé pour être tolérant à certains herbicides, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n°**EFSA-NL-2012-106**).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux 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'Anses.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été effectuée par le Groupe de Travail (GT) "Biotechnologie", réuni le 20 juin 2013. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices de l'EFSA¹ et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT Biotechnologie.

3. ANALYSE DU GT

Information générale

Le soja est une légumineuse peu envahissante, difficile à désherber par binage. La présence de graminées et de certaines plantes à graines toxiques (*Datura ferox*) gêne le développement du soja et peut entraîner la contamination des graines de soja à la récolte. La graine de soja renferme environ 40 % de protéines et 20 % d'huile en pourcentage de la matière sèche, elle renferme des facteurs anti-nutritionnels la rendant impropre à la consommation sans traitement technologique adapté. L'huile est employée principalement dans des produits comestibles comme la margarine et l'huile de cuisson. Le tourteau qui est le résidu de l'extraction de l'huile sert d'aliment riche en protéines pour le bétail. Il peut aussi subir un raffinage plus poussé qui donne divers extraits de protéines destinés à la consommation humaine. Des lécithines sont extraites et utilisées comme émulsifiant dans les produits alimentaires.

Le dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine et animale du soja génétiquement modifié DAS-44406-6 et de ses produits dérivés; elle ne concerne pas sa mise en culture.

Ce soja a été transformé pour exprimer :

- l'enzyme 2mEPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) qui confère la tolérance au glyphosate.
- l'enzyme AAD-12 (aryloxyalkanoate dioxygénase) qui confère la tolérance au 2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D)
- l'enzyme PAT (phosphinothricine acétyltransférase) qui confère la tolérance au glufosinate ammonium.

Il convient de rappeler que si ce soja venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation relative à l'utilisation des herbicides.

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

A. Identification et caractérisation du danger

A.1 Information relative à la plante parentale.

La transformation a été réalisée à partir de la variété de soja Maverick.

A.2 Caractérisation moléculaire

A.2.1 Information relative à la modification génétique.

A.2.1.1 Description des méthodes utilisées pour créer la modification génétique

Le soja DAS-44406-6 a été obtenu par agro-transformation. Les nœuds cotylédonaire ont été infectés par la souche EHA 101 d'*Agrobacterium* contenant le plasmide de transformation portant l'ADN-T. Les bourgeons transformés ont été sélectionnés sur un milieu contenant du glufosinate ammonium.

¹Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, The EFSA Journal 2011; 9(5): 2150.

Guidance document of the scientific panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plant, The EFSA Journal 2006; 99, 1-100.

A.2.1.2 Source et caractérisation des acides nucléiques utilisés pour la transformation.

L'ADN-T inséré dans le soja DAS-44406-6 est constitué de 3 cassettes d'expression des gènes *2mepsps*, *aad-12* et *pat*.

L'expression du gène **2mepsps** provient du maïs (*Zea mays*). Il est sous le contrôle du promoteur et de la région 3' non-traduite de l'histone H4A748 d'*Arabidopsis thaliana*. La cassette d'expression est stabilisée par un intron du gène de l'histone 3 d'*Arabidopsis thaliana*. L'ensemble de ces éléments génétiques permet une expression constitutive du gène dans la plante.

L'expression du gène **aad-12** provient de *Deftia acidovorans*. Il est contrôlé par le promoteur AtUbi10 d'*Arabidopsis thaliana* et la séquence 3' non-traduite AtuORF23' d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette cassette permet une expression constitutive dans les cellules de plante.

L'expression du gène **pat** provient de *Streptomyces viridochromogenes*. Il est sous le contrôle du promoteur CsVMV (Cassava Vein Mosaic Virus du manioc) et de la région 3' non-traduite AtuORF1 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette cassette induit une expression constitutive chez la plante.

Une séquence **MAR** (*matrix attachment region*) du gène RB7 du tabac (*Nicotiana tabacum*) est positionnée en aval de la cassette *2mepsps* et en orientation antisens. Cette association potentielle à la matrice nucléaire permettrait de stabiliser l'expression génique et de réduire l'incidence du « gene silencing ».

A.2.1.3 Nature et source du vecteur utilisé incluant les séquences nucléiques destinées à être insérées.

Le plasmide de transformation est un vecteur binaire de 16018 pb. Il porte les trois cassettes d'expression entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T, les séquences permettant la répllication du plasmide en système eucaryote et un gène procaryote de résistance à la spectinomycine (pour la sélection des bactéries transformées).

On peut noter que ce plasmide présente 3 répétitions de la bordure A de l'ADN-T, possiblement dans le but d'augmenter l'efficacité d'intégration.

A.2.2 Information relative à la plante GM

A.2.2.1 Description générale des caractères et des caractéristiques introduits ou modifiés

Trois caractères de résistance à trois herbicides distincts (2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D), glyphosate et au glufosinate ammonium) ont été introduits dans les sojas DAS-44406-6 grâce à l'expression des gènes codant les protéines suivantes :

- une forme mutée de la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS),
- l'aryloxyalkanoate dioxygénase-12 (AAD-12),
- la phosphinothricine acétyltransférase (PAT).

La protéine 2mEPSPS présentant une double mutation est moins sensible à l'herbicide glyphosate, ce qui permet à cette enzyme d'être active en présence de cet herbicide et de rendre ainsi la plante tolérante au glyphosate. La protéine de 2mEPSPS est codée par une version modifiée du gène *epsps* du maïs (*Zea mays*). Le gène de maïs est fusionné, en position N-terminale, à un peptide signal de localisation dans le chloroplaste. Le gène *2mepsps* code une protéine de 445 acides aminés, d'environ 47,5 kDa, conférant à la plante qui l'exprime une tolérance au glyphosate.

La protéine AAD-12 est une enzyme dont l'activité alpha cétoglutarate dépend de la dioxygénase qui permet l'inactivation métabolique des herbicides de la famille des aryloxyalkanoates. Le gène *aad-12*, qui code la protéine AAD-12, a été dérivé de *Deftia acidovorans*, une bactérie Gram-négative du sol. La séquence codante a été optimisée

pour une expression chez la plante. Le gène *aad-12* code une protéine de 293 acides aminés, d'environ 32 kDa, conférant à la plante qui l'exprime une tolérance à l'herbicide 2,4-D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique). Le 2,4-D est alors dégradé en une forme inactive, le DCP (2,4 dichlorophénol).

L'enzyme PAT acétyle le groupe amino primaire de la phosphinothricine la rendant inactive. Le gène *pat* exprimant la protéine PAT a été dérivé de *Streptomyces viridochromogenes*.

La séquence codante de *Streptomyces viridochromogenes* a été modifiée pour une expression chez la plante. Le gène *pat* code une protéine de 183 acides aminés, d'environ 21 kDa, conférant à la plante qui l'exprime une tolérance au glufosinate par acétylation.

A.2.2.2 Information sur les séquences effectivement insérées/supprimées ou altérées.

L'analyse moléculaire du soja DAS-44406-6 a été réalisée par Southern Blot. Les résultats obtenus montrent une insertion unique de l'ADN-T. Aucune séquence du squelette plasmidique n'a été retrouvée dans le génome du soja DAS-44406-6.

L'analyse par Southern Blot sur la base de cinq profils de restriction a été conduite en utilisant 10 sondes couvrant l'ADN-T et 6 sondes spécifiques du squelette plasmidique. La première caractérisation a été complétée en 2012 pour couvrir l'intégralité des séquences de l'ADN-T.

Cette analyse a été menée sur de l'ADN génomique préparé à partir de feuilles de soja DAS-44406-6 issues de 5 générations différentes. L'ADN contrôle a été préparé à partir du soja témoin Maverick.

Afin de caractériser l'insertion portée par le soja DAS-44406-6, 13659 pb de l'insert (10280 pb) et des régions flanquantes (1494 pb de la jonction 5' et 1885 pb de la jonction 3') ont été clonées et séquencées, ainsi que 7762 pb du locus d'insertion du génome de soja Maverick. L'analyse des données de séquences montre une insertion complète de l'ADN-T (10280 pb jusqu'à la bordure droite avec une insertion de 3 nucléotides (GGT) à la jonction 5'). Les régions flanquant l'insert correspondent bien à de l'ADN de soja. Les données de séquences combinées à des PCR mettent en évidence une délétion de 4383 pb au site d'insertion dans le chromosome 6 de soja DAS-44406-6.

Le locus d'insertion dans le génome du soja a été étudié selon la méthode BLAST, aucun gène endogène ou élément génétique n'a été identifié dans les 4383 pb délétées du génome de soja. Un alignement partiel a été identifié avec un membre de la famille des transcriptases inverses.

L'analyse bioinformatique des données de séquence correspondant à l'insert et à ses régions en bordure révèle des ORF potentielles au niveau des jonctions et dans l'ADN-T. L'analyse *in silico* de ces ORF ne permet pas de mettre en évidence de peptides ou de protéines connues pour leurs propriétés toxiques ou allergènes répertoriées dans les bases de données² dans leur version récente (février 2012).

A.2.2.3 Information sur l'expression des séquences modifiées ou insérées

Les niveaux d'expression des protéines 2mEPSPS, AAD-12 et PAT ont été évalués par des tests ELISA dans les feuilles à différents stades du développement, dans la plante entière, dans les racines et dans les graines à maturité. Les échantillons proviennent de plantes cultivées au champ, traitées ou non traitées par les différents herbicides (5 modalités différentes). L'essai (le même que pour l'analyse comparée de composition) a

² Comparaison avec la base de données GenBank protein sequences (nr) database, (update to March 05, 2012) et FARRP dataset, Version 12, (Released in February 2012), University of Nebraska, <http://www.allergenonline.org/>.

été conduit en 2010 et comprend 10 sites aux Etats-Unis. Le soja Maverick a été utilisé comme comparateur.

Les plus fortes concentrations sont mesurées dans les feuilles avec des valeurs atteignant environ 10, 100 et 2000 µg/g pour les protéines PAT, AAD-12 et mEPSPS, respectivement. Les concentrations moyennes dans les graines sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Concentrations moyennes des protéines 2mEPSPS, AAD-12 et PAT (en µg/g de poids sec) dans les graines de soja DAS-44406-6.

	2mEPSPS	AAD-12	PAT
Maverick	ND	ND	ND
DAS-44406-6 non traité	21,97	27,37	2,12
DAS-44406-6 2,4-D	22,17	27,34	2,13
DAS-44406-6 Glufosinate	22,22	27,34	2,11
DAS-44406-6 Glyphosate	22,80	25,77	2,15
DAS-44406-6 Tous	21,86	25,83	2,11
Moyenne	22,20	26,73	2,12

A.2.2.4 Stabilité génétique de la séquence insérée ou modifiée et stabilité phénotypique de la plante GM.

Les profils d'hybridation établis par Southern Blot sur 5 générations (T2, T3, T4, T6 et F2) sont identiques, indiquant que l'évènement d'intégration est stable.

L'analyse de la ségrégation de l'ADN-T par PCR et de l'expression de la protéine PAT montre que sur les plantes F2 testées, le rapport de 3:1 caractéristique d'une ségrégation de type mendélien est respecté.

Le phénotype de tolérance aux herbicides 2,4-D et glyphosate ségrége également de façon mendélienne.

A.2.3 Conclusion

Les informations moléculaires présentées dans le dossier pour caractériser l'évènement de transformation intégré dans le soja DAS-44406-6 ne soulèvent pas de questions particulières. Elles ne sont pas évocatrices d'un risque pour le consommateur du soja portant l'évènement DAS-44406-6.

A.3 Evaluation comparative

A.3.1 Critères de sélection des comparateurs

Pour cette analyse, le soja testé portant l'évènement DAS-44406-6 est la lignée Maverick initialement transformée et ayant subi 6 cycles d'autofécondation. Le témoin comparateur est la lignée Maverick. Six variétés commerciales de référence cultivées dans les principales régions productrices de soja aux USA ont été analysées conjointement permettant une représentation de la variabilité génétique. Les caractéristiques du plan d'expérience suivent les recommandations de l'EFSA.

A.3.2 Expérimentation en champ : dispositif expérimental et analyse statistique

A.3.2.1 Dispositif expérimental

Le soja DAS-44406-6, la variété témoin comparateur et les six variétés commerciales (3 par site) ont été cultivés en champs en 2010 sur 10 sites aux Etats-Unis avec quatre répétitions par site en blocs randomisés. Cinq modalités de traitement ont été appliquées au soja DAS-44406-6: sans traitement, traitement glyphosate, traitement glufosinate ammonium, traitement 2,4D, traitement par les trois herbicides (glyphosate, glufosinate ammonium et 2,4D).

A.3.2.2 Analyse statistique

Les caractéristiques phénotypiques, agronomiques et de composition du soja DAS-44406-6 ont été comparées au témoin Maverick par des tests de différence et aux variétés commerciales par des tests d'équivalence. Pour conduire ces tests, une ANOVA globale a été réalisée avec un modèle linéaire mixte incluant :

- un effet fixe « génotype » indiquant s'il s'agit du soja DAS-44406-6 (selon les 5 modalités de traitement), du comparateur ou des variétés commerciales),
- un effet aléatoire « site »,
- un effet aléatoire « bloc dans site »,
- un effet aléatoire « variété commerciale »,

L'erreur de type 1 retenue pour les tests de différence est de 10%. Les tests d'équivalence (à 5%) consistent à comparer la composition du soja transgénique aux valeurs observées dans les variétés commerciales incluses dans l'expérimentation.

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe « génotype » et un effet aléatoire « variété commerciale », correspond à celui proposé par l'EFSA. Les résultats des tests statistiques ont été interprétés selon l'approche décrite par l'EFSA (2010) en classant les variables en 4 catégories selon les résultats du test d'équivalence et en 7 types en combinant avec les résultats des tests de différence.

Enfin, une comparaison avec des données externes (OCDE, ILSI, références bibliographiques) de la composition chimique des graines de soja des différentes variétés connues a été réalisée.

A.3.3 Analyse de composition

L'analyse de composition a porté sur 9 composés dans le fourrage et 56 composés dans la graine crue. Environ 50% des observations sont au dessus de la limite minimale de détection et permettent une analyse statistique.

Les composés mesurés sont ceux classiquement évalués chez le soja (OCDE, 2001³). Pour le fourrage, il s'agit des macroéléments (protéines, lipides, cendres, humidité, hydrates de carbone), les fibres ADF et NDF et les minéraux calcium et phosphore.

Pour la graine, les composés analysés sont les mêmes macroéléments et fibres que pour le fourrage ainsi que 18 acides aminés, 22 acides gras, 10 minéraux (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Se, Zn), 8 vitamines (vitamine A, B1, B2, B3, B6, B9, C et E), 4 métabolites secondaires (Inositol, furfural, acides p-Coumarique, acide férulique), 3 facteurs antinutritionnels (lectine, acide phytique, inhibiteurs de trypsine, raffinose, stachyose) et 3 isoflavones (daidzéine, génistéine et glycitéine).

Résultats

Pour le fourrage

Les teneurs en eau présentent une différence mais les intervalles de confiance pour ce paramètre sont toujours dans les limites de l'équivalence déterminée par les variétés commerciales. Les teneurs en fibres (NDF) et en lipides totaux dans le soja DAS-44406-6 sont légèrement plus faibles. Du fait de la grande variabilité des mesures par rapport à la variabilité mesurée dans les variétés commerciales, le test équivalence n'est pas applicable. Cependant, les différences sont faibles et l'écart de valeur est compris à l'intérieur des données externes.

Les autres composés ne présentent pas de différence significative entre le soja DAS-44406-6 et le témoin.

³ OECD, 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: Key food and feed nutrients and anti-nutrients.

Pour la graine

L'analyse combinée de l'ensemble des sites d'expérimentation de 2010 montre que les teneurs en **macro-éléments** des graines de soja DAS-44406-6 traitées ou non avec les différents herbicides sont équivalentes.

Seule la teneur en acide gras dans le soja DAS-44406-6 non traité ou traité est légèrement plus élevée que chez le témoin. Cette teneur est au niveau de la limite supérieure estimée de la fourchette de variation de cet élément observé dans la graine de soja des variétés commerciales. Selon l'approche de l'EFSA, ce composé est classé en catégorie III où la non-équivalence est plus vraisemblable que l'équivalence. La différence reste très faible (-7%) et n'est pas susceptible en soi d'avoir des conséquences sur la santé.

Les teneurs en **minéraux, en acides gras et en vitamines** des graines de soja DAS-44406-6 traitées ou non avec les différents herbicides présentent parfois des différences avec le témoin. Cependant selon l'approche de l'EFSA, les composés sont tous classés en catégorie I (non équivalence rejetée) ou II (équivalence plus vraisemblable que la non équivalence).

Les teneurs en **acides aminés (estimées en % de poids sec)** sont toutes classées dans la catégorie I (non équivalence rejetée). Toutefois, les résultats des teneurs en acides aminés exprimées en % du total en acide aminé montrent une modification des teneurs relatives de différents acides aminés. Ainsi, les teneurs en glycine, thréonine, valine, arginine, et cystéine sont classées en catégorie III (non-équivalence plus vraisemblable) et la teneur en acide glutamique en catégorie IV (non-équivalence). Les différences sont dans tous les cas très faibles, la plus grande différence est observée pour les teneurs en cystéine qui sont de 5 à 10% plus élevées que chez le témoin, en se situant à la limite supérieure estimée de la fourchette de variation des variétés commerciales.

Parmi les **facteurs antinutritionnels, métabolites secondaires et molécules bioactives** les inhibiteurs trypsiques sont classés en catégorie II et les teneurs en lectines sont classées dans la catégorie IV de non-équivalence. Les valeurs sont plus élevées de 15 et 35% respectivement, dans la graine de soja DAS-44406-6 non traité ou traité par rapport à la graine de soja témoin. La moyenne et l'écart de valeur sont en dehors de la fourchette de variation des variétés commerciales pour les 5 modalités de traitement. Elles sont cependant trois fois plus faibles que la valeur haute de l'écart de variation OCDE, 2001.

A.3.5 Effets de la transformation de la plante en sous-produits

Aucune analyse de composition n'a été réalisée sur les produits dérivés de la graine de soja consommée principalement par les animaux (tourteau) et l'homme (huile). Le pétitionnaire considère que toutes les utilisations et processus de transformations des graines de soja sont applicables aux graines du soja DAS-44406-6.

A.3.6 Conclusion

La composition chimique du fourrage du soja DAS-44406-6 obtenu en conditions standards de culture traitée ou non avec les différents herbicides est équivalente à la composition des fourrages issus de soja témoin et des variétés commerciales testées.

Pour la graine, la composition chimique du soja DAS-44406-6 n'est pas équivalente au soja témoin. L'analyse statistique conclut à la non équivalence de la teneur en lectines dans la graine de soja DAS-44406-6 par rapport à la teneur dans la graine de soja témoin et à celles des variétés non transgéniques analysées.

A.4 Evaluation toxicologique

A.4.1 Lignes directrices normalisées des tests de toxicité

Les études toxicologiques ont été réalisées selon les protocoles et les méthodes OCDE en suivant les bonnes pratiques de laboratoire décrites dans la directive 2004/10/EC21.

A.4.2 Evaluation des protéines nouvellement produites

Trois nouvelles protéines ont été introduites dans le soja génétiquement modifié DAS 44406-6 :

- La protéine 2mEPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) provient d'un gène *epsps* modifié de *Zea mays* et diffère de la protéine native par deux substitutions d'acides aminés en positions 102 et 106.
- La protéine AAD-12 (aryloxyalkanoate dioxygénase) dérive de *Delftia acidovorans*, une bactérie du sol gram-négative et diffère de la protéine native par l'addition d'une alanine en position 2.
- La protéine PAT (phosphinothricine acétyltransférase) provient de *Streptomyces viridochromogenes*, une bactérie du sol gram-négative, elle est identique à la protéine native.

Le mode d'action de chacune des protéines a été décrit, ainsi qu'une analyse de l'activité enzymatique d'AAD-12, celles de PAT et 2mEPSPS étant déjà bien décrites.

La possibilité que l'enzyme AAD-12 utilise des substrats végétaux endogènes a été recherchée à l'aide d'un test *in vitro*. Les substrats ont été sélectionnés en fonction de leur structure chimique, de leur fonction physiologique similaire à celle de xénobiotiques connus et de leur abondance dans les voies métaboliques des plantes. Ils ont été répartis en 3 groupes : des composés naturels du soja (acide indole-3 acétique, acide abscissique, gibbérelline...), des intermédiaires phényl-propanoïdes (cinnamate, coumarate...) et les 22 acides aminés. Seules les oxydations de l'acide transcinnamique et de l'acide indole-3 acétique ont pu être observées, avec cependant des Km très élevés, indiquant que ces réactions enzymatiques ont peu de chance de se produire dans la plante.

Les équivalences entre les protéines 2mEPSPS et AAD-12 produites par *Pseudomonas fluorescens* ainsi que la protéine PAT produite par *E coli* et celles provenant du soja DAS-44406-6 ont été démontrées (par électrophorèse, western blot, analyse de glycosylation et spectroscopie de masse). Les protéines produites par les microorganismes sont utilisées pour la caractérisation et dans les tests de toxicité.

Recherche d'homologie avec des toxines connues

Une recherche d'alignement BLASTP de la séquence des trois protéines contre la base de séquences protéiques Genbank non redondante (version 05/2012) a été réalisée. Aucune homologie de séquences avec les toxines connues n'a été révélée.

Stabilité des protéines à la chaleur et résistances aux enzymes protéolytiques

Les trois protéines perdent environ 90% de leur immunoréactivité dès 50°C. Le pétitionnaire se réfère à plusieurs études publiées démontrant que les 3 protéines sont dégradées en 1 min par la pepsine.

Etudes de toxicité *in vivo*

Les gènes codant les protéines PAT et 2mEPSPS ont été introduits dans plusieurs maïs ou soja génétiquement modifiés. Ces protéines ne sont donc pas considérées comme nouvelles.

Trois études de toxicité aiguë par administration unique sont présentées et les conclusions sont les suivantes :

- La protéine 2mEPSPS n'induit ni toxicité ni mortalité chez la souris après une administration unique de 5000 mg / kg p.c. par voie orale (gavage).
- La protéine AAD-12 n'induit ni toxicité ni mortalité chez la souris après une administration unique de 2000 mg / kg p.c. par voie orale (gavage).
- La protéine PAT n'induit ni toxicité ni mortalité après une administration unique de 5000 mg / kg p.c. par voie orale (gavage).

Une étude par administration orale répétée pendant 28 jours a été réalisée pour la protéine AAD-12. Au vu des résultats de cette étude, la protéine AAD-12 n'induit pas d'effets sur les paramètres habituellement suivis en toxicologie, chez des souris traitées à la dose maximale de 47 mg/kg/jour. Compte tenu de la faible extractibilité de la protéine à partir des régimes alimentaires, la NOAEL est ramenée à 17,6 et 17,5 mg/kg/jour chez les mâles et les femelles, respectivement.

A.4.3 Evaluation des nouveaux constituants autres que les protéines
Sans objet pour le soja DAS-44406-6

A.4.4 Evaluation des constituants des denrées alimentaires et aliment pour animaux dont les niveaux sont altérés
Sans objet pour le soja DAS-44406-6

A.4.5 Evaluation de l'aliment dérivé de plante GM (denrées alimentaires et/ou aliments pour animaux)

A.4.5.1 Schéma expérimental et réalisation d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez les rongeurs.

L'étude a été conduite au cours du premier semestre 2012 et a suivi notamment les lignes directrices OCDE408.

Cinq groupes de 12 rats Crl :CD(SD) de chaque sexe ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant 20% de tourteaux toastés de soja d'origines différentes soit :

- la variété de soja « test » portant l'événement DAS-44406-6,
- la variété de soja « contrôle » lignée isogénique Maverick,
- la variété de soja commerciale Dairyland 99915,
- la variété de soja commerciale Porter 75148,
- la variété de soja commerciale William 82.

Il n'est pas précisé si le soja a été traité par les herbicides.

La composition chimique des tourteaux et des régimes a été vérifiée. Les protéines 2mEPS, PAT et AAD-12 n'ont pas été détectées dans les régimes, y compris dans ceux à base de soja test portant l'événement DAS-44406-6. Les analyses ont porté sur les principaux nutriments, paramètres proximaux, fibres, acides aminés essentiels, minéraux, vitamines, apport énergétique, ainsi que les contaminants (19), les métaux lourds (4), les pesticides (15 organochlorés, 9 organophosphorés). Aucune différence entre les régimes n'est observée.

L'évaluation a porté sur une observation quotidienne des animaux, une observation clinique détaillée hebdomadaire, le poids corporel, la consommation alimentaire, une analyse hématologique, une analyse d'urine, une analyse biochimique, le poids des organes sélectionnés et des examens macroscopiques et histologiques des tissus.

Les données provenant des animaux nourris avec les sojas DAS-44406-6 ont été comparées à celles des données provenant des animaux nourris avec les sojas contrôle. Les données des groupes nourris avec les variétés commerciales sont utilisées pour fournir des gammes de fluctuation de référence.

Les tests d'égalité des moyennes entre les groupes employés sont des tests de Student et des tests non paramétriques (Wilcoxon). L'erreur de type I a été fixée à 5%. Toutes les analyses ont été réalisées séparément pour les mâles et les femelles.

Les données atypiques ont été identifiées par un test séquentiel (erreur de type I fixée à 2%; Grubbs, 1969) et seules celles correspondant aux données de consommation ont été

exclues. Des modèles mixtes prenant en compte les corrélations entre mesures répétées dans le temps sur un même animal (poids et consommation) n'ont pas été utilisés. Les données brutes sous format électronique ne sont pas fournies.

A.4.5.2 Interprétation des études sur animaux

Aucun animal n'est mort au cours de l'étude. Le poids corporel et le gain de poids des rats mâles ayant reçu le soja DAS-44406-6 sont de 5% (NS) inférieurs à ceux du contrôle. Ils sont cependant proches de ceux nourris avec les variétés commerciales de référence.

Des différences statistiquement significatives ont été mises en évidence chez les mâles au niveau du nombre de globules blancs et de réticulocytes. La diminution de ces deux paramètres (de 25% pour les globules blancs et de 16% pour les réticulocytes) conduit à des valeurs inférieures à celles des contrôles fournis par le centre investigateur. En l'absence d'observations similaires chez les femelles et de différences sur des paramètres reliés, le pétitionnaire conclut à une absence de relation avec le traitement.

Des différences significatives ont été mises en évidence chez les femelles au niveau du nombre de globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. Les augmentations de ces 3 paramètres sont faibles (5%) et les valeurs sont proches de celles des données des variétés commerciales.

Des différences significatives ont été mises en évidence également, chez les mâles uniquement au niveau des transaminases AST, du cholestérol et des triglycérides. L'augmentation des AST de 25% est faible pour ce paramètre et se situe dans l'intervalle des valeurs des contrôles fournis par le centre investigateur. Il en est de même pour la diminution du cholestérol et des triglycérides.

Par ailleurs, aucune différence en lien avec le traitement n'est décrite sur les observations cliniques, la consommation de nourriture, les résultats des analyses urinaires, les données de poids des organes et les observations macro- et microscopiques.

La dose sans effet observé (NOEL) déduite est de 20% de soja, ce qui correspond à 11011 ou 12535 mg/jour/kg p.c. de soja chez les mâles et les femelles, respectivement.

A.4.6 Conclusion

L'évaluation de la sécurité des protéines 2mEPSPS, AAD-12 et PAT ne met pas en évidence d'éléments permettant de conclure que ces protéines ont un effet toxique sur la santé humaine et animale.

Pour évaluer la toxicité potentielle du soja DAS-44406-6 en tant qu'aliment, une étude de toxicité subchronique de 90 jours par administration orale d'une seule dose de 20% de tourteau de soja a été conduite chez les rats. Les différences significatives identifiées entre les animaux nourris avec le soja DAS-44406-6 et ceux nourris avec le soja témoin ne semblent pas être en lien avec le traitement. Toutefois, au regard des résultats de l'analyse comparée de composition qui a conclu à la non équivalence pour les teneurs en lectines, l'origine des modifications hématologiques devrait être argumentée.

Par ailleurs, cette étude, mise en œuvre après les recommandations de l'Anses et de l'EFSA publiés en 2011⁴ ne prend pas en compte l'évaluation de la puissance statistique du test. Le rapport Anses indique que la puissance des tests de différence de ces études peut, dans certains cas, être insuffisante avec 12 rats par groupe.

⁴ Anses 2011: Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM du 27 janvier 2011.
EFSA Scientific Committee 2011: EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. EFSA Journal 2011;9(12):2438.

Il devra être précisé si le soja DAS-44406-6 dont sont issus les tourteaux testés a été traité.

A.5 Evaluation de l'allergénicité

A.5.1 Evaluation de l'allergénicité des protéines nouvellement produites

L'approche préconisée par le Codex 2009 et l'EFSA (poids de la preuve), a été suivie pour apprécier l'allergénicité des trois protéines exprimées dans le soja transgénique DAS-44406-6.

Pour la protéine 2mEPSPS:

La protéine 2mEPSPS est codée par le gène *2mepsps* du maïs (*Zea mays*). Le maïs n'est pas considéré comme un allergène majeur.

Une recherche d'homologie de séquences effectuée sur une fenêtre glissante de 80 résidus et de 8 résidus ne montre pas d'homologie avec des allergènes de la banque d'allergènes FARRP⁵.

La protéine 2mEPSPS extraite de *Pseudomonas fluorescens*, est rapidement dégradée (1 min) en conditions de digestion gastrique simulée (SGF). Le pétitionnaire ne fournit pas de résultat sur la digestion de la protéine 2mEPSPS en condition de digestion intestinale simulée (SIF).

Pour la protéine PAT:

La protéine PAT est codée par le gène *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*, moisissure très répandue dans les sols dont l'allergénicité n'a jamais été rapportée.

La recherche d'homologie de séquences effectuée sur une fenêtre glissante de 80 résidus et de 8 résidus ne montre pas d'homologie avec des allergènes de la banque d'allergènes FARRP.

Aucun nouveau résultat n'est présenté, le dossier fait référence à différents avis de l'EFSA relatifs à l'évaluation de plante génétiquement modifiée exprimant cette enzyme. Il signale également l'absence de glycosylation quand elle est exprimée dans le soja.

Pour la protéine AAD-12:

La protéine AAD-12 est codée par le gène *aad-12* de *Delftia acidovorans*, qui est une bactérie commune des sols et de l'eau, utilisée dans l'industrie alimentaire.

Une recherche d'homologie de séquences effectuée sur une fenêtre glissante de 80 résidus et de 8 résidus ne montre pas d'homologie avec des allergènes de la banque d'allergènes FARRP⁵.

La protéine AAD-12 d'origine microbienne ou produite dans la plante, est rapidement dégradée en conditions de digestion gastrique simulée (SGF) puisqu'elle n'est plus détectable après seulement 30 secondes d'incubation à 37°C en présence de pepsine à pH 1,2.

En conclusion, au regard des éléments apportés ci-dessus, le potentiel allergénique des trois protéines 2mEPSPS, PAT et AAD-12 exprimées dans les graines de soja DAS-44406-6 peut être considéré comme négligeable.

Il convient de noter que si ces données ne sont pas évocatrices d'un risque allergique particulier pour le consommateur, elles 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.

A 5.2. Evaluation de l'allergénicité de l'aliment dérivé de plante GM

Le soja et ses produits dérivés font partie de la liste des allergènes alimentaires majeurs dont l'étiquetage est obligatoire selon les directives européennes 2003/89/CE et 2007/68/CE. La graine de soja renferme de nombreux allergènes caractérisés.

⁵ FARPP Allergen Database version 12 (February 2012 release).

Le caractère allergénique du soja impose de vérifier si la présence du transgène peut modifier le potentiel allergénique du soja transgénique. Deux études ont été réalisées, une analyse par inhibition d'un test ELISA et une analyse par Western bi-dimensionnel en utilisant des sérums de patients allergiques au soja pour révéler les allergènes.

La première étude montre une réponse IgE similaire vis-à-vis du soja DAS-44406-6 et du soja non GM Maverick utilisé comme comparateur.

Les Western obtenus à l'aide de 6 sérums de patients allergiques au soja ne montrent pas de différences qualitatives et quantitatives majeures entre les allergènes révélés du soja DAS-44406-6 et ceux du soja Maverick utilisé comme comparateur.

Ces résultats confirment que la teneur en allergènes du soja DAS-44406-6 n'est pas différente de celles du comparateur isogénique et des variétés conventionnelles de soja non GM.

A.5.3 Propriétés adjuvantes

L'analyse bioinformatique ne montre aucune identité ou homologie de séquence entre la protéine AAD-12 et des protéines à propriétés adjuvantes, des toxines notamment.

Pour les protéines PAT et 2mEPSPS, il est rappelé que ces protéines sont présentes dans d'autres plantes (soja, maïs) et qu'elles sont donc déjà présentes dans l'alimentation humaine et animale. Aucun effet adjuvant n'a été décrit pour ces protéines.

A.5.4 Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère que le potentiel allergénique et adjuvant des protéines 2mEPSPS, PAT et AAD-12 exprimées dans le soja transgénique DAS-44406-6 peut être considéré comme extrêmement faible et que l'allergénicité du soja transgénique DAS-44406-6 ne semble pas modifiée par rapport à celle du soja non transgénique.

La consommation de soja transgénique DAS-44406-6 et des produits qui en dérivent, ne présente *a priori* pas de risque d'allergénicité supérieur à celle d'un soja non transgénique.

A.6 Evaluation nutritionnelle

A.6.1 Evaluation nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées des PGM

L'analyse comparative de composition démontre que, pour les constituants mesurés (à l'exception de la teneur en lectines), la composition des graines et du fourrage provenant de soja DAS-44406-6 est équivalente à celles provenant de soja témoin. Aucune modification de la qualité nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées des sojas DAS-44406-6 n'est attendue. Par conséquent, aucune évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées du soja DAS-44406-6 n'est présentée.

A.6.2 Evaluation nutritionnelle des aliments pour animaux dérivés des PGM

Une étude d'alimentarité a été réalisée chez des poulets de façon à comparer les caractéristiques nutritionnelles du soja DAS-44406-6 avec celles du soja témoin isogénique et celles de 3 variétés commerciales. Le matériel testé est le tourteau de soja, la fraction délipidée de la graine. Le protocole met en œuvre 600 poulets Ross/Ross 708 (2 sexes X 5 parquets X 5 traitements alimentaires X 12 poulets) nourris pendant 42 jours. Durant cette période, 3 régimes alimentaires sont utilisés, un régime de démarrage, un régime de croissance et un régime de finition contenant respectivement 39 %, 35 % et 31% de tourteau de soja. Tous les régimes sont supplémentés avec 4 % d'huile de soja dont l'origine n'est pas précisée.

L'analyse de la composition chimique (énergie métabolique, teneurs en protéines, minéraux et acides aminés) des graines et des tourteaux de chaque soja utilisés a été réalisée. Cette analyse confirme une teneur plus élevée de lectines dans le soja DAS-44406-6. La contamination éventuelle par onze mycotoxines a aussi été recherchée, elles ne sont pas détectables. La présence de pesticides (15 organo-chlorés et 8 organo-

phosphorés) a été recherchée ; aucun n'est détectable dans les tourteaux utilisés dans l'expérience.

Cependant, le pétitionnaire aurait dû faire la même recherche sur les résidus de glyphosate, glufosinate d'ammonium et 2,4D.

Au final, les analyses de composition chimique sur les 5 tourteaux de soja et tous les régimes alimentaires ont les mêmes caractéristiques. Ils sont bien équilibrés et montrent une formulation de type commercial utilisée pour le poulet en croissance en accord avec les recommandations du NRC guide (nutriment requirements for poultry).

La mortalité des poulets a été suivie. Elle est faible (0,2%) et sans lien avec le traitement. Dix poulets ont été euthanasiés pour des raisons sanitaires sur la période de 42 jours sans aucune relation avec le traitement. Les autres observations ont porté sur 6 paramètres de croissance, 13 mesures de rendement en découpe des carcasses.

Aucune différence n'a été observée entre les animaux nourris avec le tourteau issu du soja DAS-44406-6 et l'ensemble des animaux recevant les tourteaux issus de soja témoin isogénique et des variétés commerciales, à l'exception d'une faible augmentation (+7,5%) significative dans les deux sexes du poids de la cuisse chez les poulets nourris avec le régime contenant le soja DAS-44406-6. Aucune différence n'est observée entre les animaux nourris avec le tourteau issu du soja DAS-44406-6 et l'ensemble des animaux recevant les tourteaux issus des variétés commerciales.

A.6.3 Conclusion

Au regard des résultats de l'étude menée chez le poulet en croissance, le tourteau issu du soja DAS-44406-6 présente les mêmes qualités nutritionnelles que ceux issus du soja isogénique et des variétés de soja conventionnelles testées dans cette étude.

B. Evaluation de l'exposition – consommation/ extension d'emploi

L'exposition aux trois protéines 2mEPSPS, PAT et AAD-12 a été calculée pour l'homme et les animaux en prenant la teneur moyenne mesurée dans les graines. La quantité dans les tourteaux, dans la coque et dans la fraction aspirée de la graine⁶ en a été déduite en appliquant un facteur de 1.1, 0.28 et 20, respectivement.

Chez l'homme et selon le modèle EU PRIMo V2, la part de soja maximale consommée en Europe est de 0,61 g/kg p.c. pour les adultes (en Pologne) et de 2,31 mg / kg p.c. pour les enfants (en Allemagne). A noter que la part de soja maximale consommée en Asie et aux USA est plus importante (d'un facteur 5 pour les adultes et d'un facteur 2,5 pour les enfants).

Chez les animaux, suivant le type de produit, la quantité de produit consommée et la quantité de protéine présente dans ces produits, le porc est l'espèce animale la plus exposée à la protéine 2mEPSPS et le poulet est l'espèce animale la plus exposée aux protéines PAT et AAD-12.

C. Caractérisation du risque

Risque par rapport à la présence des protéines 2mEPSPS, PAT et AAD-12.

Dans une approche maximalisée où tout le soja consommé est du soja DAS-44406-6, les marges d'exposition calculées par le pétitionnaire pour chacune des 3 protéines sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Marges d'exposition calculées pour les protéines 2mEPSPS, PAT et AAD-12 chez l'homme et l'animal.

⁶ Fraction de la graine ayant subi une aspiration pour éliminer la fine pellicule qui la recouvre.

Population	Protéine		
	2mEPSPS	AAD-12	PAT
Humaine adulte	369222	122699	>400000
Humaine enfant	97500	32415	>400000
Porcs ou poulets	4347	1449	4552

Les marges d'exposition calculées et présentées dans le tableau 2 sont très importantes. Cependant, ces marges sont déduites d'études de toxicité aiguë et non pas d'études de toxicité sub-chronique alors qu'une telle étude est disponible pour la protéine AAD-12.

Si l'on se base sur les données de l'étude de toxicité sub-chronique pour la protéine AAD-12, la marge d'exposition est 100 fois moins importante soit 1227 et 324, respectivement chez l'adulte et l'enfant.

Les marges d'exposition ainsi calculées pour la protéine AAD-12 sont toujours considérées comme suffisantes.

En conclusion, l'évaluation de la sécurité des 3 protéines nouvellement introduites dans les sojas DAS-44406-6 et les marges de sécurité très élevées indiquent qu'il est très peu probable que ces protéines puissent avoir des effets toxiques chez l'homme ou l'animal.

4. CONCLUSION DU GROUPE DE TRAVAIL

Concernant la partie moléculaire, l'analyse des éléments présentés permet de caractériser l'événement de transformation DAS-44406-6 et n'est pas évocatrice d'un risque pour le consommateur de soja DAS-44406-6.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique des graines du soja DAS-44406-6 mettent en évidence une équivalence pour de nombreux composés mesurés, mais une non-équivalence pour la teneur en lectines qui est plus élevée dans le soja transgénique que dans les autres sojas témoin ou variétés commerciales. Dans ces conditions, l'équivalence n'est pas totalement démontrée.

Les résultats des performances et rendements de carcasses observés dans l'étude d'alimentarité conduite chez les poulets en croissance montrent que les qualités nutritionnelles ne sont pas modifiées dans le tourteau de soja DAS-44406-6 en comparaison avec celles du tourteau de soja témoin ou des variétés commerciales de soja.

Concernant l'évaluation de la sécurité de consommation du soja DAS-44406-6, l'analyse des données fournies sur les trois protéines nouvellement introduites ne met pas en évidence d'éléments qui pourraient permettre de conclure à un effet toxique dû à la présence de ces protéines.

Dans l'étude de toxicité subchronique de 90 jours, les différences statistiquement significatives identifiées entre le soja DAS-44406-6 et le témoin ne semblent pas être en lien avec le traitement. Toutefois, au regard des résultats de l'analyse comparée de composition qui conclut à la non équivalence pour la teneur en lectines, l'origine des modifications hématologiques devrait être argumentée. De plus, les conditions de l'étude où une seule dose a été mise en œuvre, sont insuffisantes pour exclure un lien entre les résultats des deux études (composition et étude 90 jours).

Enfin, compte tenu de la date de réalisation de l'étude 90 jours, les recommandations de l'EFSA et de l'Anses portant notamment sur la puissance du test auraient dû être suivies,

Par ailleurs, le soja utilisé doit être traité par le ou les herbicides auxquels il est tolérant, ce point est à préciser.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie ». Sur la base du dossier initial disponible dans les délais prévus, l'Agence émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du règlement (CE) n°1829/2003, du soja génétiquement modifié DAS-44406-6, développé pour être tolérant à certains herbicides.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

OGM, soja DAS-44406-6, mEPSPS, PAT, AAD-12, tolérance au glufosinate, tolérance au glyphosate, tolérance 2,4 D.