

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 juillet 2017

AVIS

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

**relatif à l'évaluation de certaines données complémentaires relatives au soja génétiquement
modifié A5547-127 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2008-52)**

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

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

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

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

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 13 mars 2017 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à l'évaluation de certaines données complémentaires relatives au soja génétiquement modifié A5547-127 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2008-52).

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 les dossiers initiaux. Dans ce cadre, le dossier n° EFSA-GMO-NL-2008-52 de demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié A5547-127 a été évalué par l'Afssa¹ en 2008 (saisine 2008-SA-0231). Dans son avis du 15 octobre 2008 (Afssa, 2008), l'Agence indiquait qu'en l'absence d'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 avec du glufosinate-ammonium, elle ne pouvait se prononcer sur la sécurité sanitaire des sojas portant l'événement de transformation A5547-127.

Depuis cette date, des données complémentaires ont été fournies par le pétitionnaire concernant le dossier n° EFSA-GMO-NL-2008-52, mais celles-ci ne comportaient pas d'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rongeur.

¹ Depuis le 1^{er} juillet 2010, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) ont fusionné pour devenir l'Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses).

En revanche, le dossier du soja MON87708 x MON89788 x A5547-127 (n° EFSA-GMO-NL-2016-135), déposé en 2016, contient une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours réalisée avec le soja A5547-127. Le pétitionnaire justifie la fourniture de cette étude par l'entrée en vigueur du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, qui précise que dans le cas de plantes génétiquement modifiées empilées, chaque parent doit avoir fait l'objet d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours. Toutefois, cette étude ayant été menée en 2009, il est regrettable que le pétitionnaire ne l'ait pas fournie dans le cadre de l'évaluation du soja A5547-127 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2008-52), qui ne s'est terminée qu'en avril 2011 (EFSA GMO Panel, 2011). Cela aurait permis à l'Anses d'évaluer cette étude sitôt l'avis de l'EFSA publié et, le cas échéant, d'actualiser dès 2011 l'avis du 15 octobre 2008 (Afssa, 2008). Par ailleurs, le dossier du soja FG72 x A5547-127 (dossier n° EFSA-GMO-NL-2013-120), déposé après l'entrée en vigueur du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, aurait dû contenir cette étude.

Dans ce contexte, l'Anses a choisi, en accord avec la DGCCRF et le GT « Biotechnologie », d'actualiser son avis du 15 octobre 2008 relatif au soja A5547-127 (Afssa, 2008), dans la perspective de l'examen de plantes génétiquement modifiées empilées comportant cet événement de transformation.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 16 mars, le 18 mai et les 14-15 juin 2017. Elle a été menée sur la base de rapports initiaux rédigés par deux rapporteurs, en se fondant sur les lignes directrices du Panel GMO de l'EFSA (2006, 2011, 2014) et sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

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

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GROUPE DE TRAVAIL

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous. Seuls sont renseignés les paragraphes pour lesquels une actualisation de l'avis de l'Afssa du 15 octobre 2008 (Afssa, 2008) est nécessaire.

(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 deux fragments d'ADN :

- un fragment de 3119 pb constitué de la cassette d'expression du gène d'intérêt *pat*, de l'origine de répllication 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 (3438 pb) montre qu'il comprend :

- 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 le 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 répllication bactérienne *ori* ;
- une séquence de 442 pb correspondant à l'extrémité 3' du gène *bla* (base 420 à 861 de la région codante).

La séquence de la cassette d'expression du gène *pat*, jusqu'à la région 3'*bla* incluse, contenue dans l'évènement A5547-127 est identique à celle du plasmide de départ. Concernant la région 5'*bla*, une délétion de 28 pb de la région codante, comprenant l'ATG, a été observée. Par conséquent, les deux séquences partielles du gène *bla* ne constituent pas un gène *bla* intact. Des analyses de type northern blot 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 celles 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 site d'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. Huit ORF potentielles ont été identifiées, dont une seule possède tous les éléments requis pour une expression. Aucune de ces huit ORFs putatives ne présente d'homologie de séquence avec 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 A5547-127 cultivés en serre et traités avec du glufosinate-ammonium. Les échantillons ont été prélevés aux stades végétatifs V3 et V8. L'expression la plus forte est mesurée dans la tige au stade V3 ($39,18 \pm 3,04$ µg/g de matière fraîche, soit 0,83 % des protéines extractibles totales). Dans les feuilles, la teneur la plus élevée est observée au stade V8 ($26,22 \pm 9,87$ µg/g de matière fraîche) et le pourcentage de protéine PAT par rapport aux protéines extractibles totales augmente fortement entre V3 et V8 (de 0,22 à 0,72 %). 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 avec du glufosinate-ammonium, cultivées en plein champs aux Etats-Unis en 1999. Les données montrent que la teneur en protéine PAT dans la graine est très faible (de l'ordre de 20 µg/g de matière fraîche) et que le traitement avec du glufosinate-ammonium ne modifie pas cette teneur.

(7.6) Effets des traitements technologiques

Les dosages de la protéine PAT réalisés avec la technique ELISA dans différents produits issus de la graine de soja A5547-127 montrent qu'en raison de sa sensibilité thermique, la protéine PAT y est présente à des teneurs qui sont de l'ordre de 10 µg/g de matière fraîche dans les coques et de

80, 70 et 13 ng/g de matière fraîche dans l'isolat de protéines, le tourteau et le tourteau toasté, respectivement. Elle n'est pas détectable dans l'huile raffinée et la lécithine brute.

(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 maximalisées dans le sens où l'on considère que la totalité des produits dérivés consommés proviendrait du soja A5547-127. Sur la base d'une quantité moyenne de 20 µg/g de protéine PAT dans les graines de soja, la consommation maximale calculée pour l'Homme est de 62,6 µg de protéine PAT/personne et par jour.

(7.8.4) Etude de la toxicité sub-chronique

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été menée en 2009, selon la ligne directrice OCDE 408 (à l'exception du nombre de doses testées) et selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Cette étude ayant été fournie dans le dossier n° EFSA-GMO-NL-2016-135 déposé en 2016, le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique, de même que les recommandations de l'Anses (2011), du Comité scientifique de l'EFSA (2011) et de l'EFSA (2014).

Quatre groupes de 10 rats mâles et 10 rats femelles, lignée Wistar, ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant les doses suivantes de tourteau de soja toasté :

- 15 % de la variété témoin A5547 non génétiquement modifiée ;
- 15 % de la variété génétiquement modifiée A5547-127 ;
- 5 % de la variété génétiquement modifiée A5547-127 + 10 % de la variété témoin A5547 ;
- 15 % d'une variété commerciale non génétiquement modifiée.

L'origine des graines de soja utilisées pour préparer les tourteaux incorporés dans les régimes alimentaires n'est pas précisée. Il n'est donc pas possible de connaître la nature des traitements reçus par les plantes et de savoir si le soja A5547-127 a été traité avec l'herbicide auquel il est tolérant. Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux 4 groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants et toxines. Il aurait été utile de doser également les résidus des herbicides utilisés lors de la culture. La stabilité des aliments pendant la durée de l'essai a été vérifiée.

Le pétitionnaire a réalisé des analyses de variance (ANOVA) et des tests de comparaison des moyennes entre groupes. L'erreur de type 1 a été fixée à 5 % et 1 %. Les analyses ont été menées séparément pour les mâles et les femelles. Selon le pétitionnaire, les quelques différences statistiquement significatives observées entre les groupes traités et le groupe témoin ne sont pas biologiquement pertinentes. Cependant, la dose de 15 % utilisée ne correspond pas à la dose maximale préconisée par l'EFSA (2014). Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul ne sont pas fournis. Par ailleurs, le pétitionnaire n'a pas utilisé de modèles mixtes prenant en compte les corrélations entre mesures répétées dans le temps sur un même animal. Le nombre d'animaux (10 rats/groupe/sexe) ne correspond pas aux recommandations de l'Anses (2011) et du Comité scientifique de l'EFSA (2011) en la matière. Dans ces conditions et dans la mesure où le pétitionnaire ne fournit pas d'analyse de la puissance, alors qu'il s'agit d'une exigence du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013, cette étude de toxicité sub-chronique de 90 jours n'est pas jugée recevable par le GT « Biotechnologie ».

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

Les données complémentaires fournies par le pétitionnaire ne sont pas de nature à modifier les conclusions de l'avis de l'AFSSA du 15 octobre 2008 (AFSSA, 2008) concernant la caractérisation moléculaire du soja A5547-127, qui n'est pas évocatrice d'un risque lié à l'utilisation de ce soja en alimentation animale ou humaine. En revanche, l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours

fournie à l'occasion du dépôt du dossier n° EFSA-GMO-NL-2016-135 ne permet pas de lever la réserve exprimée à ce sujet dans l'avis initial de l'Afssa (Afssa, 2008).

Dans ces conditions, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du soja A5547-127.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable à la demande d'autorisation de mise sur le marché du soja A5547-127 au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003.

Dr Roger GENET

MOTS-CLES

OGM, soja A5547-127, tolérance au glufosinate-ammonium, PAT

GMO, A5547-127 soybean, glufosinate-ammonium tolerance, PAT

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa. 2008. "Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 15 octobre 2008 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."
- Anses. 2011. Recommandations pour la mise en œuvre de l'analyse statistique des données issues des études de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM. Avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective, 95 pages.
- EFSA. 2014. "Explanatory statement for the applicability of the Guidance of the EFSA Scientific Committee on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed for GMO risk assessment." *EFSA Journal* 12 (10): 3871, 25 pp.
- EFSA GMO Panel. 2011. "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2008-52) for the placing on the market of herbicide tolerant genetically modified soybean A5547-127 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience." *The EFSA Journal* 9 (5): 2147, 1-28.
- EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." *EFSA Journal* 99: 1-100.

- EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." *EFSA Journal* 9 (5): 2150, 37 pp.
- EFSA Scientific Committee. 2011. "Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed." *EFSA Journal* 9 (12): 2438, 21 pp.
- NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).
- OCDE. 1998. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents." Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).
- Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.
- Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.