

AVIS

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

relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié MON 87701, résistant à des insectes, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM au titre du règlement (CE) n°1829/2003.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Afssa a été saisie le 21 juin 2010 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), d'une demande d'avis relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié MON87701 résistant à des insectes, pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (dossier n°EFSA-BE-2010-79).

2. CONTEXTE

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 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.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective été réalisée par le Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 7 juillet 2010.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire suit les sections des lignes directrices de l'EFSA relatives aux demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

(A) Information générale

Le soja est une culture des zones chaudes à semi-tropicales. C'est une légumineuse peu envahissante et difficile à désherber en condition de printemps normale. 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). Le soja contient aussi de nombreuses protéines naturellement allergènes. 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.

La demande concerne une autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine et animale du soja génétiquement modifié MON87701 et de ses produits dérivés; elle ne concerne pas sa mise en culture.

Les sojas MON87701 expriment la protéine CRY1Ac qui confère à la plante la résistance à certains lépidoptères (*Anticarsia gemmatilis*, *Pseudoplusia includens*, *Epinotia aporema* ou *Rachiplusia nu*). Ces lépidoptères ne sont pas présents sur le continent européen.

Ce soja a été évalué récemment par l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'alimentation humaine et animale du soja MON87701xMON89788 (saisine 2010-SA-0307) issu du croisement de MON87701 et de MON89788. L'avis se fonde sur les éléments de l'évaluation précédente et évalue les éléments nouveaux apportés dans le présent dossier.

(C) Informations relatives à la modification génétique

(1) Le soja MON87701 a été obtenu par transformation de méristèmes de soja du cultivar A5547, à l'aide d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette technique de transformation permet d'introduire directement le gène dans le gerplasme de la lignée élite. Le vecteur (15,5kb) est composé de deux ADN-T, l'un contenant une cassette d'expression du gène *cry1Ac* et l'autre une cassette d'expression du gène *cp4epsps*. Le premier événement issu de la transformation contenait donc deux insertions dans des *loci* distincts et indépendants. Le gène *cp4epsps* a été utilisé comme marqueur de transformation, puis l'insert contenant *cp4epsps* a été éliminé par ségrégation. Au final, le soja MON87701 est issu de plusieurs cycles d'auto-pollinisation et ne contient qu'un seul insert comprenant la cassette d'expression du gène *cry1Ac*.

(2) La cassette d'expression du gène *cry1Ac* est composée de :

- la bordure droite de l'ADN-T ;
- le promoteur et la partie 5' transcrite non traduite du gène de la rubisco (sous unité 1A) d'*Arabidopsis thaliana* ;
- la séquence codant le peptide de transit vers les chloroplastes de la rubisco (sous unité 1A) d'*Arabidopsis thaliana* ;
- le gène codant la protéine CRY1Ac de *Bacillus thuringiensis* (recodé pour une expression compatible avec l'usage des codons chez les plantes) ;
- la région 3' du gène *sphas1* de soja codant la β -conglycinine, une protéine de stockage de la graine, comprenant 35 nucléotides de la séquence codante (extrémité C-terminale) ainsi qu'un codon stop et une séquence de polyadénylation ;
- la bordure gauche de l'ADN-T.

La protéine CRY1Ac, exprimée dans les sojas MON87701, présente plus de 99% d'identité de séquence en acides aminés avec la protéine de *Bacillus thuringiensis*. Elle diffère de la protéine native par 4 acides aminés supplémentaires issus du peptide de transit en son

extrémité N-terminale et par 7 acides aminés répartis dans la séquence. Ces acides aminés ne modifient pas l'activité insecticide de la protéine.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

Des hybridations de type Southern ont été effectuées sur l'ADN du soja MON87701, en utilisant des sondes couvrant pratiquement l'intégralité du vecteur de transformation et permettant de détecter la présence des deux ADN-T, ainsi que des régions du vecteur en dehors des ADN-T. L'analyse des résultats montre que le soja MON87701 contient une copie de l'ADN-T comprenant la cassette d'expression CRY1AC et ne contient aucun autre fragment d'ADN issu du plasmide.

- (2) L'analyse de la structure de l'insert et des régions en bordure a été réalisée par PCR et par séquençage en comparant les résultats avec la lignée non transgénique A5547. Cette analyse confirme une insertion unique de 6426 pb comprenant la cassette d'expression intacte de CRY1Ac. Le séquençage des régions génomiques flanquant l'insert (2kb de chaque côté) a mis en évidence des microdélétions en 5' et 3' de l'insertion. Le résultat de l'alignement de ces séquences avec les séquences de base de données montre qu'il s'agit bien d'une séquence génomique de soja qui ne correspond pas à une séquence codante connue. L'insertion ne semble pas s'être produite dans un gène endogène de soja.

Afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence n'a été créée par l'insertion, une étude bioinformatique a été réalisée pour rechercher la présence d'ORF (open reading frame) putatives entre deux codons stop dans les 6 cadres de lecture, au niveau des régions de bordures de l'insert. Cinq séquences de plus de 8 acides aminés ont été mises en évidence de chaque côté de l'insert. La comparaison des séquences peptidiques de ces 10 ORF avec les séquences contenues dans les bases de données ne montre pas d'homologie avec des toxines, des allergènes ou des peptides ayant une activité biologique connue¹.

(3) Informations relatives aux produits d'expression des transgènes

Les niveaux d'accumulation de la protéine CRY1Ac ont été mesurés au cours du développement et dans plusieurs tissus du soja MON87701 par la méthode ELISA, à partir d'échantillons provenant d'essais en champs réalisés sur deux lieux différents (US et Argentine) pendant deux saisons (2007 et 2007-2008).

Les niveaux moyens d'accumulation de CRY1Ac sont reportés dans le tableau 1 dans les feuilles au stade 4. Par ailleurs, on note que le niveau moyen le plus élevé est observé dans les feuilles au stade 1 des échantillons provenant de l'essai Argentin (450 µg/g poids sec).

Tableau 1 : Teneurs en CRY1Ac en µg/g de poids sec des principaux tissus de soja MON87701.

	Teneurs moyennes en CRY1Ac en µg/g de poids sec (gamme)	
	Etats-Unis 2007	Argentine 2007-2008
Feuille stade 4	340 (78-960)	180 (78-250)
Fourrage	29 (8,2-95)	70 (10-150)
Graine	4,7 (3,4-5,7)	5,1 (3,9-6,7)
Racine	< LDD ²	< LDD

¹ Banques de données : TOX_2009 (version 169.0) est un sous groupe de la base de données PRT-2009 AD_2009 (janvier 2009) est une banque regroupant les séquences d'allergènes, de gliadines et de gluténine.

² Inférieure à la limite de détection.

(5) Informations relatives à la stabilité génétique de l'insert et à la stabilité phénotypique de la plante

Après la transformation initiale, le soja MON87701 a subi neuf cycles d'autofécondation. Les résultats d'expérience d'hybridation par Southern indiquent que le transgène est stable dans le génome des sojas MON87701 de la 4^{ème} à la 9^{ème} génération (R4 à R9). Les analyses de ségrégation (autofécondations et croisements issus des programmes de sélections) sont conformes aux lois de la génétique mendélienne, confirmant que l'insertion est unique et s'est faite au niveau du génome nucléaire.

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**(7.1-3) Analyse comparative de la composition chimique**

Deux études sont présentées dans le dossier, dont l'objectif est de comparer la composition chimique du soja MON87701 et de son témoin A5547 (lignée dans laquelle l'événement est introgressé). Une étude porte sur des échantillons cultivés en champs en Argentine (5 sites) saison 2007-2008 et l'autre sur des échantillons cultivés aux Etats-Unis (5 sites) en 2007.

Dans les 2 essais, toutes les variétés transgéniques et contrôles ainsi que 20 variétés commerciales conventionnelles ont été cultivées conjointement.

L'analyse de composition des échantillons a porté :

- pour la plante entière, sur sept paramètres proximaux (protéines totales, hydrates de carbones totaux, fibres ADF et NDF, humidité, cendres et lipides) ;
- pour la graine, sur les 7 paramètres proximaux précédents, 18 acides aminés, 14 acides gras (12 pour les échantillons issus de l'essai Argentin), la vitamine E, 5 facteurs antinutritionnels (lectine, acide phytique, inhibiteur de trypsine, raffinose et stachyose) et 3 isoflavones (daidzéine, génistéine et glycitéine).

L'analyse statistique des résultats, tous sites combinés, met en évidence des différences significatives entre le soja MON87701 et le soja de référence pour 15 composés parmi les 55 mesurés. Dans tous les cas, l'amplitude de la différence est faible et les valeurs moyennes entrent dans l'intervalle de confiance de la population des variétés de référence.

(7.4) Analyse comparative des caractéristiques agronomiques

Les caractères agronomiques et phénotypiques des sojas ont été comparés à ceux de plantes témoins (lignée A5547). Vingt variétés commerciales ont été cultivées conjointement afin de déterminer une gamme de valeurs de référence. Les observations ont été effectuées dans les 2 essais Argentin et Américain précédemment décrits. Les caractéristiques agronomiques de la variété MON 87701 ne sont pas significativement différentes de la variété de référence A5547 et des variétés commerciales. Comme attendu, les seules différences statistiquement significatives entre les variétés concernent la résistance à certains insectes.

(7.5-6) Spécificité des produits, effets des traitements

Les différentes étapes de transformation de la graine sont décrites ainsi que les produits destinés à l'alimentation humaine et animale en résultant.

L'effet des traitements technologiques de la graine notamment l'effet de la chaleur conduit à la destruction de certains facteurs antinutritionnels.

Aucune donnée quantitative de la teneur en protéine CRY1Ac dans les produits de transformation du soja n'est fournie. Toutefois, un facteur de correction est appliqué afin de calculer l'exposition de l'homme et de l'animal à la protéine CRY1Ac. Ce facteur permet de tenir compte de l'enrichissement en protéine totale qui se produit lors de la transformation de la graine en tourteau.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Les sojas MON 87701 sont destinés à la même utilisation que les sojas non transgéniques pour tous les modes de consommation chez l'homme et l'animal.

Une estimation quantitative de la consommation de produits alimentaires contenant du soja dans les grandes zones européennes, considérant que la totalité du soja consommé est du soja génétiquement modifié MON 87701, a été présentée.

(7.8) Toxicologie

Sécurité de l'organisme donneur et de la protéine Cry1Ac

La sécurité des sojas MON87701 (organisme donneur et produit d'expression du transgène) est basée sur les éléments suivants :

- l'organisme donneur du gène *cry1Ac* est *Bacillus thuringiensis*, une bactérie largement répandue dans l'environnement de l'homme et des animaux et n'est pas connue pour avoir des effets délétères pour la santé ;
- la protéine CRY1Ac présente une forte homologie de séquence avec les protéines de la même famille qui sont très répandues dans de nombreux micro-organismes ;
- une analyse *in silico* réalisée indique que la protéine CRY1Ac ne présente aucune homologie de séquence avec des protéines toxiques connues répertoriées dans les banques de données actualisées ;
- La protéine est présente en très faible quantité dans la partie de la plante consommée ;
- une protéine CRY1Ac, exprimée et isolée d'une souche d'*E. coli*, et démontrée comme équivalente³ de celle exprimée dans les sojas, n'induit pas de mortalité chez la souris lorsqu'elle est administrée par voie orale (gavage) à la dose maximale de 1290 mg/kg p.c. chez les femelles et 1460 mg/kg p.c. chez les mâles.

(7.8.4) Étude de toxicité sub-chronique

Deux études d'une durée de 90 jours ont été menées successivement.

La première étude a été réalisée sur des groupes de 12 rats par sexe, avec une seule dose d'incorporation (30%) dans la ration alimentaire du tourteau de soja toasté et délipidé. Les rats ayant reçu le soja MON87701 ont été comparés à ceux ayant reçu le soja témoin quasi-isogénique. Trois autres groupes recevant du tourteau de soja issu de 3 variétés commerciales ont également été étudiés.

Le poids corporel moyen et le gain pondéral sont significativement diminués dans le groupe femelle ayant reçu MON87701 versus groupe témoin femelle, en relation avec une baisse de la consommation. Sur le plan hématologique, une baisse de l'hémoglobine et des éosinophiles est notée chez ces femelles. En l'absence de modifications des autres paramètres de la lignée rouge et d'effet chez les mâles, les faibles variations observées, qui demeurent dans la plage de fluctuation des valeurs des données historiques, ne sont pas considérées comme reliées à la consommation du soja MON87701. De plus, les examens histologiques ne mettent pas en évidence d'anomalies.

Les données, relatives au poids corporel du groupe femelles ayant reçu le soja MON87701, ont conduit le pétitionnaire à réaliser une seconde étude mettant en œuvre des effectifs plus importants par groupe (20 rats SD de chaque sexe) et deux doses d'administration de soja MON87701 (15% et 30%⁴). Les mêmes paramètres que précédemment ont été mesurés en dehors des examens histologiques.

Il n'est pas retrouvé de différence de poids reproductible entre les deux études : une légère augmentation du poids corporel et du gain pondéral est observée chez les mâles dans la seconde étude, alors que les baisses précédemment rapportées chez les femelles ne sont

³ L'équivalence entre la protéine CRY1Ac produite à partir d'*E. coli* et celle exprimée dans les sojas est démontrée : identité entre les protéines (migration en SDS-PAGE, Western blot, masse et séquence des fragments tryptiques, séquence N-terminale, composition en acides aminés), état de glycosylation et activité biologique insecticide.

⁴ Un taux d'incorporation de 30% correspond à 22 g/kg p.c. chez les mâles et 25,5 g/kg p.c. chez les femelles.

pas confirmées. Les quelques modifications des paramètres hématologiques et biochimiques sont considérées comme faibles et dans les limites des variations des données historiques, sans relation dose-effet, ni relation avec des paramètres ayant les mêmes cibles (organes et tissus). Par ailleurs, il n'existe pas de convergence entre les modifications observées dans les deux études successives.

(7.9) **Allergénicité**

Le pétitionnaire démontre l'absence d'allergénicité de la protéine CRY1Ac en s'appuyant sur les données suivantes :

- ✓ Absence de risque allergique de l'organisme source ;
- ✓ Absence d'homologie de séquence avec des allergènes connus, soutenue par une étude bioinformatique récente (2009) ;
- ✓ Hydrolyse rapide en milieux gastriques et intestinaux. Ces travaux récents (2008) démontrent que la protéine CRY1Ac est rapidement hydrolysée, moins de 30 secondes, en milieu gastrique simulé. Cependant, un peptide d'environ 4 kDa est résistant à la dégradation. Cette analyse a été complétée par une étude de digestibilité en milieu intestinal simulé et les résultats obtenus démontrent que dans ces conditions expérimentales, la protéine CRY1Ac, y compris le peptide résiduel de 4kDa, est totalement dégradée en 1 minute ;
- ✓ Absence de glycosylation de CRY1Ac.

De plus, le pétitionnaire fournit deux études expérimentales permettant d'évaluer le potentiel allergisant des sojas génétiquement modifiés. Ainsi, au cours de la première, la capacité de liaison (ELISA) des immunoglobulines E de patients allergiques et non allergiques au soja aux fractions protéiques du soja génétiquement modifié MON 87701 et de sojas conventionnels a été comparée. La deuxième étude visait à quantifier en western blot, la fixation des IgE de patients allergiques au soja, aux protéines extraites de différents sojas, dont MON87701 après séparation électrophorétique bidimensionnelle.

Ces études ne révèlent pas de différence entre les protéines extraites de sojas génétiquement modifiés MON87701 et celles issues des sojas témoin (A5547) et conventionnels qui présentent les mêmes propriétés.

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 chez des poulets de façon à comparer les caractéristiques nutritionnelles du soja MON87701 avec le témoin A5547.

Le protocole met en œuvre 900 poulets (450 mâles et 450 femelles, 10 répétitions par traitement) nourris pendant 42 jours avec deux régimes [correspondant aux périodes de démarrage (0-21 jours), de croissance et de finition 21-42 jours]] à base de tourteau de soja génétiquement modifié (à 33 et 30 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du soja témoin A5547 ou 6 variétés commerciales de soja.

L'analyse de composition chimique de l'aliment a été réalisée, les résultats vérifient ceux de la partie 7.1 et ne montrent pas de différence entre le soja génétiquement modifié MON87701 et le soja témoin.

Les observations ont porté sur 6 paramètres zootechniques, 7 données de carcasse, 3 paramètres sur la composition de 2 muscles des animaux découpés. Le taux de mortalité est enregistré pour la période 0-7 jours et 7-42 jours.

Pour la première période (0-7 jours), le taux de mortalité des poulets ayant reçu le soja MON87701 est de 5 % alors qu'il varie de 0.83 à 4.17% dans les autres groupes. Pour la seconde période (7-42 jours), ce taux (toujours 5%) est encore supérieur aux taux des autres groupes (0 à 2%). Le taux de mortalité est donc plus élevé dans le groupe ayant reçu les sojas MON87701 pour les deux périodes. Aucun test statistique n'est réalisé sur ce

paramètre, permettant d'identifier si ce taux correspond à une différence significative. En outre, cette observation ne fait l'objet d'aucun commentaire de la part du pétitionnaire. En accord avec la demande formulée par l'EFSA (arrêt d'horloge du 21/06/10), il est souhaitable de clarifier ce point.

En dehors de cette observation, l'analyse statistique des résultats des paramètres mesurés dans l'étude ne met en évidence aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec les sojas MON87701 génétiquement modifiés et les sojas témoins A5547 ou les variétés commerciales testées pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire.

5. CONCLUSION

Les éléments présentés dans le dossier permettent de caractériser l'événement de transformation MON87701 d'un point de vue moléculaire. Ils permettent également de montrer que ces sojas n'ont pas une composition chimique différente comparée aux sojas témoins quasi-isogéniques et aux variétés conventionnelles de sojas.

Les données présentées relatives à la sécurité des sojas MON87701 permettent de conclure à une absence de toxicité de la protéine exprimée dans le soja et de la plante elle-même, dans les conditions expérimentales rapportées.

Une étude d'alimentarité a été conduite chez le poulet durant 42 jours. Aucune différence sur les paramètres observés n'a été mise en évidence entre les poulets nourris avec le soja transgéniques et ceux nourris avec les sojas témoins. Toutefois, le taux de mortalité, enregistré dans le groupe ayant reçu les sojas transgéniques MON87701, dans l'étude d'alimentarité nécessite une clarification. En conséquence, l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime qu'elle ne peut se prononcer sur la sécurité sanitaire du soja MON87701 sur la base du dossier initial.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : soja MON87701 résistance à des lépidoptères, tolérance au glyphosate, CRY1Ac.