

## **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 SYHT0H2, développé afin de présenter une tolérance à plusieurs 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 18 janvier 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 SYHT0H2, développé afin de présenter une tolérance à plusieurs herbicides, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n°**EFSA-DE-2012-111**).

#### **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 21 mars 2013. L'évaluation du dossier se base sur les lignes directrices de l'EFSA<sup>1</sup> 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 entraîne 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 émulsifiants 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 SYHT0H2 et de ses produits dérivés; elle ne concerne pas sa mise en culture.

Ce soja a été transformé pour exprimer :

- l'enzyme PAT (phosphinotricine acétyl transferase), qui confère la tolérance au glufosinate ammonium). PAT est une enzyme de détoxification par acétylation du glufosinate ammonium ayant une action inhibitrice de la glutamine synthétase.
- l'enzyme AvHPPD-03 (*p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) provient de l'avoine (*Avena Sativa*) et confère la tolérance aux herbicides de type mésotrione<sup>2</sup>.

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 variété de soja 'Jack' a été choisie pour ses aptitudes à la transformation génétique et parce qu'il s'agit d'une lignée commercialisée.

##### **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**

---

<sup>1</sup>Guidance 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.

<sup>2</sup> Il convient de rappeler que si ce soja venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation relative à l'utilisation des herbicides.

Le soja SYHT0H2 a été obtenu suite à la transformation génétique de graines immatures de la variété 'Jack' à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant un plasmide, portant l'ADN-T à transférer. L'ADN-T contient les deux gènes d'intérêt.

Les sojas contenant l'événement de transformation ont été sélectionnés par le glufosinate ammonium, présent tout au long du processus de régénération.

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

L'ADN-T inséré, dans les sojas SYHT0H2, est constitué des éléments suivants :

- Le promoteur de l'ARN 35S du CaMV (Cauliflower mosaic virus).
- La partie « enhancer » du promoteur FMV (Figwort mosaic virus).
- La partie « enhancer » du promoteur TMV (Tobacco mosaic virus).
- Les promoteurs CMP et SMP du CmYLCV (Cestrum Yellow Leaf Curling Virus).
- Le gène codant l'enzyme PAT (phosphinotricine acétyl transférase), qui confère la tolérance au glufosinate ammonium). Le gène *pat* provient de la souche de *Streptomyces viridochromogenes*, Tü494.
- Le gène codant l'enzyme AvHPPD-03 (*p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) provenant de l'avoine, qui confère la tolérance aux herbicides de type mésotrione.
- Le terminateur de transcription du gène *nos* (Nopaline synthase) d'*A. tumefaciens*.

Il contient aussi de courtes séquences ayant permis le clonage des différents éléments.

#### 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 10904pb qui contient, en plus de l'ADN-T, divers éléments permettant sa réplication dans *E. Coli* et dans *A. tumefaciens*, et sa sélection dans *E. Coli*,

L'ADN-T comprend, coté bordure droite, une copie du gène *avhppd-03* et coté bordure gauche deux copies en tandem du gène *pat*. Les trois gènes sont clonés dans la même orientation pour leur cadre de lecture, l'expression du premier gène *pat* est dirigée par le promoteur de l'ARN 35S du CaMV et le deuxième gène par le promoteur CMP du CmYLCV.

### A.2.2 Information relative à la plante GM

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

Deux caractères de résistance à deux herbicides distincts ont été introduits dans les sojas SYHT0H2 :

- la résistance au glufosinate ammonium apporté par le gène *pat*.

Celui-ci est dérivé de la lignée de *S. viridochromogenes* et code l'enzyme PAT (phosphinotricine acétyl transférase) qui détoxifie la L-phosphinotricine en catalysant son acétylation. La phosphinotricine aussi appelée glufosinate ammonium est un inhibiteur de la glutamine synthétase. L'inhibition de cette enzyme provoque une diminution de la production de glutamine et une accumulation d'ammoniac dans les tissus qui conduit à la mort des plantes traitées.

- la tolérance aux herbicides de type mésotrione apporté par le gène *avhppd-03*.

Celui-ci provient de l'avoine et code l'enzyme AvHPPD-03 (*p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase), une isoforme qui a moins d'affinité pour l'herbicide que le gène endogène de soja. La mésotrione appartient à la famille des benzylcyclohexane-1,3-dione qui agit par inhibition compétitive des HPPD, enzymes qui catalysent la seconde étape de la voie de biosynthèse de la tyrosine. La surexpression de la protéine AvHPPD-03 ayant naturellement moins d'affinité pour les herbicides inhibiteurs des HPPD, permet à la plante d'être tolérante à l'herbicide.

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

Des hybridations de type Southern ont été réalisées sur 8 profils de restrictions avec 12 sondes couvrant chaque élément de la cassette d'expression et du plasmide de transformation.

Ces hybridations ont portées sur l'ADN génomique extrait de feuilles provenant :

- de plantes transgéniques homozygotes SYHT0H2
- de plantes non GM utilisées comme contrôle négatif (lignée isogénique 'Jack'),
- du plasmide de transformation avec un nombre équivalent de 1 à 3 copies par génome de plante utilisé comme contrôle positif.

L'analyse des profils d'hybridation montre une insertion à un seul locus, constituée d'une copie partielle de l'ADN-T en tandem inverse (coté 5') et d'une copie presque complète de l'ADN-T (coté 3'). Aucun signal n'est obtenu avec les sondes spécifiques du plasmide situées en dehors de l'ADN-T indiquant l'absence de ces séquences dans le génome de soja.

La construction insérée dans l'évènement SYHT0H2 a été entièrement séquencée sur 7914 pb incluant les cassettes d'expression en tandem inversées ainsi que 1000 pb des bordures génomiques adjacentes 5' et 3'. Aucun changement de nucléotides n'est observé dans les cassettes d'expression.

En revanche des délétions des extrémités des deux copies d'ADN-T en tandem inverse sont confirmées :

- l'ADN-T coté 5' a perdu la bordure droite, toute la cassette d'expression du gène *avhppd-03* et une partie du promoteur de l'ARN 35S contrôlant l'expression du premier gène *pat*, ainsi que la bordure gauche
- l'ADN-T coté 3' a perdu la bordure droite, la partie enhancer du FMV et une partie du promoteur de l'ARN 35S contrôlant l'expression du gène *avhppd-03*, ainsi que la bordure gauche.

Un certain nombre d'insertions sont aussi mis en évidence :

- une insertion de 7pb à la jonction entre l'ADN-T et la région 3' adjacente
- une insertion de 44 pb entre les deux ADN-T en tandem inversées, ces 44 pb ont des similarités avec la séquence du gène *avhppd-03*.
- une insertion de 17 pb au sein de l'ADN-T entier, plus précisément dans le promoteur de l'ARN 35S contrôlant l'expression du premier gène *pat*, 15 de ces 17 pb correspondent à une duplication de la séquence juste en amont de cette insertion.

Les séquences, de l'évènement SYHT0H2, adjacentes en 5' et en 3' de l'insertion correspondent bien à du génome nucléaire de soja. Leur comparaison avec la séquence de la lignée parentale 'Jack' montre que les bordures 5' et 3' sont contigües suggérant l'absence d'un réarrangement de l'ADN génomique au site d'insertion.

Une délétion de 15 nucléotides du génome de la plante est mise en évidence au site d'insertion en 5'.

Une analyse bioinformatique (BLASTn et BLASTx) de la séquence du génome de la plante au niveau du site d'insertion ne met en évidence aucune séquence codante et/ou de fonction connue correspondant à un gène.

Une analyse bioinformatique a été réalisée pour s'assurer qu'aucune nouvelle séquence créée par l'insertion ne pouvait donner lieu à la synthèse d'une protéine présentant un danger. Les ORFs ont été identifiées au niveau des jonctions entre le génome du soja et l'ADN-T ainsi que dans l'insert. Ces séquences ont été comparées à celles des banques de toxines. Aucune de ces ORF ne présente d'homologie significative avec des toxines connus.

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

Les trois gènes d'intérêt agronomique, le gène *avhppd-03* et les deux gènes *pat* sont sous le contrôle de promoteurs constitutifs.

Les niveaux d'expression de ces protéines 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. Les échantillons proviennent de plantes cultivées au champ, traitées ou non traitées par les deux herbicides, réparties sur 4 sites de culture de soja en Argentine pendant la saison 2011/2012.

Les enzymes AvHPPD-03 et PAT ont été détectées dans tous les tissus des plantes transgéniques, traitées ou non par l'herbicide. Les valeurs des concentrations de HPPD et de PAT sont comparables dans les échantillons traités et non-traités par l'herbicide. Les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans les feuilles jeunes (stade V4) avec des concentrations moyennes aux alentours de 300 µg/g de poids sec pour AvHPPD-03 et de 50 µg/g de poids sec pour PAT. Les concentrations moyennes dans le fourrage et dans les graines sont indiquées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Concentrations moyennes des protéines AvHPPD-03 et PAT (µg/g de poids sec) dans le fourrage et les graines de soja SYHT0H2.

	AvHPPD-03		PAT	
	Soja SYHT0H2 Traité	Soja SYHT0H2 Non traité	Soja SYHT0H2 Traité	Soja SYHT0H2 Non traité
Fourrage (stade R6)	92,99 +/-36,16	79,66+/-44,43	29,73 +/-21,08	19,17 +/-18,61
Graines (stade R8)	7,91 +/-8,3	8,18 +/-8,36	3,89 +/-5,45	2,70 +/-4,04

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

La stabilité de l'insertion portant les gènes de tolérance aux herbicides a été vérifiée sur plusieurs générations et croisements, par des analyses de type Southern ainsi que par une étude de la ségrégation des caractères d'intérêt agronomique.

Les caractères de résistance aux herbicides se comportent comme un caractère unique et dominant qui s'hérite de façon mendélienne.

A.2.3 Conclusion

L'ADN-T intégré dans l'événement de transformation SYHT0H2 est localisé à un seul locus. Il est constitué de deux copies tronquées de l'ADN-T positionnées en tandem inversées et séparées par 44 pb correspondant à de la séquence du gène *avhppd-03*. Au final, le fragment intégré contient 4 gènes *pat* et un gène *Avhppd-03*.

Le séquençage complet de l'insertion met en évidence des délétions et des insertions aux jonctions du site d'insertion dans le génome du soja et dans les ADN-T par rapport à l'ADN-T initiale.

Le séquençage des régions du génome de la plante adjacentes à l'insertion a été réalisé sur plus de 1000 nucléotides à chaque extrémité. Elles correspondent bien à du génome de soja et sont contigües chez la lignée conventionnelle parentale.

Une analyse bioinformatique a été réalisée et montre que l'insertion de l'ADN-T dans le génome du soja n'a pas créé de nouvelles ORFs ayant des homologies avec des toxines connues.

Les niveaux d'expression de la HPPD et de la PAT ont été étudiés sur différents organes, à différents stades du développement de la plante. Le traitement herbicide ne modifie pas le niveau d'expression des deux enzymes.

Les données moléculaires présentées permettent une caractérisation précise de l'événement de transformation des sojas SYHT0H2. Leurs analyses ne sont pas évocatrices d'un risque pour le consommateur de soja SYHT0H2.

### **A.3 Evaluation comparative**

#### **A.3.1 Critères de sélection des comparateurs**

Pour cette analyse, le soja portant l'événement SYHT0H2 testé est la lignée Jack transformée et ayant subi 6 cycles d'autofécondation. Le témoin comparateur est la lignée 'Jack' non transformée.

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

##### **A.3.2.1 Dispositif expérimental**

La variété transgénique SYHT0H2 et la variété témoin comparateur ont été cultivées en champs en 2010 sur 8 sites aux Etats-Unis avec quatre répétitions par site en blocs randomisés. La variété transgénique a été cultivée avec 2 modalités de traitement : sans traitement herbicide (NT, non traité) et avec un traitement herbicide (mésotrione et glufosinate ammonium) (T, traité). Six variétés commerciales ont également été cultivées conjointement sur les 8 sites.

##### **A.3.2.2 Analyse statistique**

Le soja SYHT0H2 (T ou NT) est comparé au témoin comparateur 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 SYHT0H2 (T) ou (NT), 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 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 7 sous catégories selon la combinaison des résultats du test d'équivalence et de différence.

#### **A.3.3 Analyse de composition**

L'analyse de composition a porté sur le fourrage et les graines.

Les composés mesurés sont ceux classiquement évalués chez le soja (OCDE, 2001). Pour le fourrage, il s'agit des macroéléments (humidité, protéines, lipides, cendres, hydrates de carbone) ainsi que les fibres ADF et NDF.

Pour la graine, les composés analysés sont les mêmes macroéléments et fibres que pour le fourrage ainsi que 18 acides aminés, 22 acides gras, 5 minéraux (Ca, Fe, Mg, P, K), 5 vitamines (vitamine A, B1, B2, B9, K1), 8 dérivés de la vitamine E (tocophérols et tocotrienols), 3 isoflavones (daidzéine, glycitéine, génistéine) et 5 facteurs antinutritionnels (lectine, acide phytique, raffinose, stachyose, inhibiteurs de trypsine).

## **Résultats**

### **Pour le fourrage**

Les tests de différence ne montrent pas d'écart entre les plantes soja SYHT0H2 et témoin pour la plupart des composés analysés. Seules les concentrations des cendres du soja SYHT0H2 non traité, de l'humidité et des lipides du soja SYHT0H2 traité herbicide sont statistiquement différentes du témoin comparateur. Toutefois ces différences sont faibles.

### **Pour la graine**

Les résultats des tests de différence et d'équivalence sont synthétisés dans le dossier technique. Pour la plupart des composés, et malgré quelques tests de différence statistiquement significatifs, il est possible de conclure à l'équivalence entre la graine de soja SYHT0H2 et la graine de soja du comparateur.

Parmi, les composés qui se retrouvent dans les sous-catégories 6 ou 7 (non équivalent aux variétés de référence ou non équivalent plus probable qu'équivalent), on retrouve dans la comparaison soja **SYHT0H2 non traité versus variétés commerciales** :

- *α-tocopherol* (sous-catégorie 7)
- *γ-tocopherol* (sous-catégorie 6)

dans la comparaison soja **SYHT0H2 traité versus variétés commerciales** :

- *α-tocopherol* (sous-catégorie 6)

Des différences statistiquement significatives existent aussi pour les  $\delta$ -tocophérol (Soja SYHT0H2 non traité et traité). On observe une diminution de 6-7% dans le soja GM pour la teneur en  $\alpha$ -tocopherol et une augmentation de 7 à 12% pour la teneur en  $\delta$ -tocopherol et de 25-30% pour la teneur en  $\gamma$ -tocopherol. Dans tous les cas, ces composés sont quantitativement mineurs (environ 0,07%) et les valeurs moyennes entrent dans la gamme des valeurs mesurées sur les variétés commerciales non transgéniques.

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

Les graines ont été traitées dans une usine pilote équivalent à une usine classique pour élaborer des produits destinés à l'alimentation animale ou humaine (lait, tofu, pellicules, farines, tourteaux,...). Des tests ELISA ont été pratiqués pour quantifier les niveaux de protéines AvHPPD-03 et PAT dans les produits obtenus.

Les concentrations de la protéine AvHPPD-03 sont plus élevées dans la farine grasse que dans la graine initiale car cette farine est obtenue à partir d'une graine dépelliculée sans chauffage et sans utilisation de solvant.

Les deux protéines sont détectées dans les graines, les pellicules, la farine grasse, les flocons, les tourteaux délipidés toastés issus de graines de soja SYHT0H2. Elles ne sont pas détectées dans le concentrat protéique, l'isolat, le jus ou le tofu.

Les profils en acides gras des huiles extraites des graines de soja SYHT0H2 et témoin ont été réalisés. Les valeurs des 13 acides gras dont les teneurs sont quantifiables sont comparées à des données bibliographiques. Seules les teneurs en acide palmitoléique et heptadécanoïque, à la limite du seuil de détection, sont légèrement supérieures aux données bibliographiques.

#### A.3.6 Conclusion

Pour la plupart des composés analysés, la composition chimique du fourrage et des graines du soja SYHT0H2 obtenu en conditions standards de culture, traité ou non avec les herbicides (mésotrione et glufosinate ammonium) est équivalente à la composition des fourrages et des graines issus de soja témoin et des variétés commerciales testées.

On observe des différences significatives sur les teneurs en certains tocophérols ( $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Il est possible que ces variations soient en lien avec l'expression du gène *avhppd-03* dont l'enzyme intervient dans la voie de biosynthèse des tocophérols.

Toutefois, considérant les faibles différences observées et la nature des composés, aucun impact sur la sécurité sanitaire n'est attendu.

#### A.4 Evaluation toxicologique

##### A.4.1 Lignes directrices normalisées des tests de toxicité

L'EFSA recommande la mise en œuvre des protocoles validés par l'OCDE. Ces lignes directrices ont été respectées pour l'évaluation de la protéine AvHPPD-03

##### A.4.2 Evaluation des protéines nouvellement produites

Les protéines considérées pour cette évaluation sont les protéines PAT et HPPD-03. Les gènes codant les protéines ont été introduite dans *E. coli* pour y produire les protéines et les utiliser dans les tests de toxicité. Les équivalences entre ces protéines et celles présentes dans le soja SYHT0H2 ont été vérifiées en comparant leurs caractéristiques structurales et leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, leur masse moléculaire, leur immunoréactivité, leur activité enzymatique, leur état de non glycosylation, la séquence de leurs peptides internes sont similaires. Seule la séquence N-terminale de la protéine HPPD produite dans *E. coli* comporte 4 acides aminés supplémentaires, ces résidus sont clivés dans le soja.

Le gène *pat* provient de *Streptomyces viridochromogenes*, un actinomyces aérobie du sol non pathogène. Les acétyltransférases sont des enzymes très répandues dans le monde végétal et animal. La protéine PAT a une structure très voisine d'autres acétyl-transférases présentes dans les aliments. Elle est exprimée dans de nombreuses plantes transgéniques.

Le gène *Avhppd-03* est issu de l'avoine (*Avena sativa*), un aliment commun pour l'Homme et les animaux.

#### Recherche d'homologie avec des toxines connues

Une approche *in silico* a été conduite avec chacune des deux protéines, pour lesquelles des programmes et des bases de données actualisées<sup>3</sup> ont été utilisées. Aucune homologie de séquences avec les toxines connues n'ont été révélées.

#### Instabilité à la chaleur et en présence de fluides digestifs

La protéine PAT est complètement inactivée après 10 minutes à 55°C, et la protéine Av-HPPD-03 après 30 minutes à plus de 65°C. Ces températures sont inférieures à celles des traitements thermiques appliqués lors de la transformation de la graine de soja (toastage et floconnage).

Les deux protéines sont également rapidement dégradées en présence de fluide gastrique et intestinal.

#### Essai de toxicité *in vivo*

##### **Protéine PAT**

Le gène codant cette protéine a été introduit dans plusieurs maïs ou soja génétiquement modifiés. La protéine n'est donc pas considérée comme nouvelle.

Un essai de toxicité aiguë est néanmoins présenté, avec administration par voie intraveineuse chez la souris. A noter que cette voie d'administration présente peu d'intérêt en toxicologie alimentaire.

La dose de 10 mg/kg n'a entraîné aucun signe de toxicité sur les 5 femelles que comprenait l'expérimentation.

---

<sup>3</sup> Bayer toxin database : 93 167 séquences protéiques de Uniprot\_SwissProt et GenPept avec les mots clés suivants: calicin, channel block, harmful, noxious, poison, venin, porin, lectin, toxic, knottin, toxin, venom, channel inhibitor ; complété par les séquences de la base Animal Toxin Database (ATDB; <http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin>).

### **Protéine AvHPPD-03**

Cette protéine, considérée comme nouvelle, a fait l'objet d'un essai de toxicité après administration répétée pendant 28 jours chez le rat, comme le recommande les LD de l'EFSA.

L'essai a été conduit selon les lignes directrices OCDE et les BPL. Trois lots de 10 rats (5 mâles et 5 femelles) âgés de 5 semaines ont reçu respectivement une dose de 2, 10 et 51 mg/kg p.c./jour. La plus haute dose représente 1000 fois la dose de protéine que recevrait un consommateur, si tout le soja de son alimentation, est du soja SYHT0H2.

Aucun effet néfaste n'a été observé sur le gain de poids, la consommation alimentaire, l'état clinique, les examens hématologiques, biochimiques, nécropsiques et histologiques. La NOAEL déduite de cette étude est donc de 51 mg/kg p.c./jour.

Un essai de toxicité aiguë a été également réalisé chez la souris sur des lots de 10 animaux de chaque sexe, avec 3 doses de protéine : 500, 1500 et 2000 mg/kg. Aucun effet néfaste n'a été relevé à la plus haute dose testée.

#### A.4.3 Evaluation des nouveaux constituants autres que les protéines

Sans objet pour soja SYHT0H2

#### A.4.4 Evaluation des constituants des denrées alimentaires et aliment pour animaux dont les niveaux sont altérés

Sans objet pour soja SYHT0H2

#### 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.

Aucune étude toxicologique n'a été réalisée avec un aliment issu des sojas SYHT0H2.

##### A.4.5.2 Interprétation des études sur animaux

Aucune étude toxicologique n'a été réalisée avec un aliment issu des sojas SYHT0H2.

#### A.4.6 Conclusion

Les données relatives à l'évaluation de la toxicité potentielle des protéines PAT et HPPD-03 ne conduisent pas à suspecter une toxicité.

Toutefois, les informations toxicologiques sont insuffisantes en l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur avec l'aliment. Ainsi, le risque potentiel lié à la consommation d'aliments issus du soja SYHT0H2 ne peut être rigoureusement évalué.

### **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 deux protéines exprimées dans le soja transgénique SYHT0H2.

#### **Origine des gènes et recherche d'homologies de séquences**

La protéine AvHPPD-03 est codée par le gène *avhppd-03* de l'avoine (*Avena sativa*) dont l'allergénicité est connue. A côté des allergènes du pollen, responsables de pollinoses, les grains d'avoine renferment des allergènes responsables d'allergies de contact (chitinase) et d'allergies alimentaires (globuline 11S). Dans les cas d'intolérance au gluten (maladie cœliaque), l'avoine est généralement bien tolérée cependant ses graines renferment les homologues des gliadines (avénines) responsables de cette intolérance.

Une recherche d'homologie de séquence utilisant des fenêtres de 80 et de 8 résidus vis à vis d'une banque de séquences (banque FARRP AllergenOnline, 2012) regroupant des allergènes avérés ou présomptifs et des protéines impliquées dans la maladie cœliaque,

ne met en évidence aucune homologie significative de la protéine AvHPPD-03 avec les séquences répertoriées dans la base.

La protéine **PAT** est codée par le gène *pat* de la bactérie à Gram+ *Streptomyces viridichromogenes* souche Tü494. A l'exception de *Streptomyces viridis*, les autres espèces de *Streptomyces* ne sont pas considérées comme allergéniques. Toutefois, une étude réalisée en 2006 sur des plantes GM exprimant la protéine PAT, a montré que les sérums d'individus allergiques réagissaient davantage à la protéine PAT que les individus témoins non allergiques. Il s'agit essentiellement d'une interaction PAT-IgE non spécifique car elle était fortement diminuée en présence de NaCl 1M. Ces résultats indiquent néanmoins que la protéine PAT serait potentiellement allergénique puisque des IgE existent, à très faible taux, chez les individus allergiques et non allergiques.

Une recherche d'homologie de séquence utilisant des fenêtres de 80 et de 8 résidus vis à vis de banque de séquences FARRP AllergenOnline 2012, regroupant des allergènes avérés ou putatifs ne montre aucune homologie significative de la protéine PAT avec des allergènes connus.

#### **Analyse des ORF potentiel identifiés au niveau des régions flanquantes de l'insert**

Une analyse bioinformatique des régions flanquantes de l'insert et de la totalité de l'insert ne fournit aucune ORF présentant une homologie de séquence avec des allergènes connus (banque de séquences FARRP AllergenOnline 2012), à l'exception d'une poly-sérine de 9 résidus que l'on retrouve dans trois allergènes potentiels du blé. Aucun élément dans le dossier ne permet de savoir si ce polypeptide est exprimé.

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 les 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.

Une étude a été réalisée afin de déterminer si la présence du transgène pouvait modifier le potentiel allergénique du soja transgénique. Cette étude analyse douze allergènes importants du soja. Ces allergènes ont été dosés par spectrométrie de masse (méthode AQUA® utilisant des peptides radio-marqués non redondants comme étalons internes) dans le soja transgénique, dans le comparateur isogénique et dans 17 variétés conventionnelles de soja non GM:

- pour 11 des 12 allergènes choisis, les concentrations obtenues pour le soja transgénique et le comparateur isogénique, se situent dans l'intervalle de confiance/tolérance TI calculé pour les 17 variétés non GM.
- pour l'inhibiteur de Kunitz 3 (KTI3), les valeurs obtenues pour le soja transgénique et pour le comparateur isogénique sont supérieures à l'intervalle de confiance/tolérance TI calculé à partir des 17 variétés non GM; la concentration en KTI3 du comparateur isogénique est supérieure à celle du soja transgénique et cette observation n'est donc pas liée à la présence du transgène.

En outre, la réactivité IgE du soja transgénique comparée à celles du comparateur isogénique et de deux variétés conventionnelles non GM, sont très similaires ; le profil obtenu par Western blot est identique, aucune fraction IgE-réactive supplémentaire n'est détectée dans le soja transgénique.

L'ensemble de ces résultats confirme que la teneur en allergènes du soja SYTH0H2 n'est pas différente de celles du comparateur isogénique et des variétés conventionnelles de soja non GM.

#### A.5.3 Propriétés adjuvantes

Les analyses bioinformatiques ne montrent aucune identité ou homologie de séquence entre les protéines PAT et AvHPPD-03 et des protéines à propriétés adjuvantes, des toxines notamment. La faible résistance à la protéolyse digestive de ces deux protéines permet de supposer qu'elles ne persistent pas suffisamment longtemps dans le tractus digestif pour exercer un effet adjuvant sur d'autres antigènes. D'autre part, l'absence de protéines dans l'huile de soja commercialisée permet d'écarter l'hypothèse d'une activité adjuvante de cette huile.

#### A.5.4 Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère que le potentiel allergénique des protéines PAT et AvHPPD-03 exprimées dans le soja transgénique SYTH0H2 peut être considéré comme extrêmement faible.

L'allergénicité du soja transgénique SYTH0H2 ne semble pas modifiée par rapport à celle du soja non transgénique.

La consommation de soja transgénique SYTH0H2 et des produits qui en dérivent, ne présente *a priori* pas de risque d'allergénicité supérieur à celle d'un soja non transgénique. Les protéines PAT et AvHPPD-03 exprimées dans le soja transgénique SYTH0H2 ne présente apparemment aucune propriété adjuvante.

Toutefois, il serait nécessaire de vérifier l'expression de la séquence codant le polypeptide de 9 serines successives.

### A.6 Evaluation nutritionnelle

#### A.6.1 Evaluation nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées des PGM

La modification génétique n'a pas pour objectif de modifier la composition chimique et les qualités nutritionnelles du soja SYHT0H2.

L'analyse comparative de composition démontre que, pour les constituants mesurés, la composition des graines et du fourrage provenant de soja SYHT0H2 est équivalente à celles provenant de soja témoin. Aucune modification de la qualité nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées des sojas SYHT0H2 n'est attendue. Par conséquent, aucune évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires dérivées du soja SYHT0H2 n'est présentée.

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

Pour les mêmes raisons que dans le point précédent, aucune évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux dérivés des sojas SYHT0H2 n'est présentée.

#### A.6.3 Conclusion

Pour les raisons évoquées précédemment et conformément aux LD en vigueur, aucune évaluation nutritionnelle (denrées alimentaires et aliments pour animaux) n'est présentée.

La mise en œuvre d'une étude d'alimentarité aurait toutefois permis de compléter les données d'analyse comparative de composition et de réduire l'incertitude d'évaluation du risque.

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

Le principal produit alimentaire pour l'homme à base de soja est l'huile, qui ne contient plus de protéine.

La présence des protéines AvHPPD-03 et PAT dans notre alimentation sera donc essentiellement liée à d'autres produits dérivés (lécithine, farine, lait de soja, sauces...),

dont la consommation journalière n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation dans l'Union Européenne.

L'exposition proposée par le pétitionnaire a été estimée pour l'Homme sur la base de données de consommation du programme GEMS (2008) de l'OMS et du modèle EFSA PRIMo (2007). Ces derniers montrent que la consommation de soja est plus basse en Europe (quel que soit le pays) qu'au Japon. Pour se placer dans les conditions d'exposition maximale, la consommation au Japon a été considérée.

L'évaluation du risque pour le consommateur présentée dans le dossier est basée sur les données relatives aux deux protéines.

La teneur en protéines prise en compte est celle mesurée dans les graines de soja avant tout traitement, ce qui maximalise l'exposition.

### **C. Caractérisation du risque**

#### **Risque par rapport à la présence des protéines PAT et AvHPPD-03**

Ainsi, si tout le soja consommé est du soja SYHT0H2, l'évaluation de la marge d'exposition calculée par le pétitionnaire, respectivement chez l'enfant et l'adulte est de :

- 30000 et 50000 pour AvHPPD-03.
- 300 et 600 pour PAT

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 AvHPPD-03.

Si l'on se base sur les données de l'essai 28 jours pour la protéine AvHPPD-03, on obtient des marges d'exposition de 700 et 1300 respectivement chez l'enfant et l'adulte.

Les marges d'exposition ainsi calculées pour la protéine AvHPPD-03 sont suffisantes. Il en est de même pour celles calculées pour la protéine PAT ; même si le calcul est déduit d'une valeur de toxicité aiguë, il a été fait en se plaçant dans la situation de pire cas qui apparaît peu probable.

#### **Risque par rapport à la plante entière**

En l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rongeur avec l'aliment, le GT estime que le risque potentiel lié à la consommation d'aliments issus du soja SYHT0H2 ne peut être totalement évalué.

## **4. CONCLUSION DU GT**

Concernant la partie moléculaire, l'analyse des éléments présentés permet de caractériser l'événement de transformation SYHT0H2 et n'est pas évocatrice d'un risque pour le consommateur de soja SYHT0H2.

L'analyse comparée de composition chimique permet de conclure pour la plupart des composés mesurés à l'équivalence de composition entre le fourrage et les graines de soja SYHT0H2 et le fourrage et les graines des sojas témoin et des variétés commerciales testées. On observe cependant des différences significatives sur les teneurs en certains tocophérols ( $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ).

Il est possible que ces variations soient en lien avec l'expression du gène *avhppd-03* dont l'enzyme intervient dans la voie de biosynthèse des tocophérols. Cependant, considérant les faibles différences observées et la nature des composés, aucun impact sur la sécurité sanitaire n'est attendu.

Aucune donnée permettant l'évaluation des qualités nutritionnelles des produits issus des sojas SYHT0H2 n'est fournie. L'évaluation de l'allergénicité potentielle des protéines

AvHPPD-03 et PAT et des sojas SYHT0H2 ne met pas en évidence d'éléments concluant à un risque d'allergénicité.

Cependant, la mise en œuvre d'une étude d'alimentarité sur animaux cibles aurait permis de compléter les données d'analyse comparative de composition et de réduire l'incertitude d'évaluation du risque. De même, l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours à partir d'un produit issu du soja SYHT0H2 traité avec les herbicides ne permet pas de réaliser une évaluation complète du risque toxicologique de ce soja.

## **5. CONCLUSION 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 SYHT0H2, développé afin de présenter une tolérance à plusieurs herbicides.

Par ailleurs, l'Anses précise que les lignes directrices actuelles ne prévoient pas d'études d'alimentarité systématique lorsque l'analyse de composition conclut à l'équivalence entre l'OGM et le témoin comparateur. Toutefois, cette étude non obligatoire était très fréquemment présentée dans les dossiers et semble désormais être de moins en moins fournie par les pétitionnaires. L'Anses en accord avec le GT « Biotechnologie » estime pourtant que cette étude apporte un complément utile aux dossiers d'évaluation présentés.

**Le directeur général**

Marc Mortureux

## **MOTS-CLES**

OGM, soja SYHT0H2, PAT, HPPD, tolérance au glufosinate ammonium, tolérance au mésotrione.