

Maisons-Alfort, le 25 avril 2006

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché
d'un soja génétiquement modifié A2704-12 tolérant à un herbicide,
pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et
de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 février 2006 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un soja génétiquement modifié A2704-12 tolérant à un herbicide, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale de grains et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-NL-2005-18).

Conformément au règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Afssa.

Après consultation du Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 20 avril 2006, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

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

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

Le soja A2704-12 est rendu tolérant à un herbicide, le L-glufosinate d'ammonium par l'introduction d'un gène *pat*, isolé d'un microorganisme du sol : *Streptomyces viridochromogenes*, codant une protéine enzymatique PAT, la phosphinothricine acétyl-transférase, qui métabolise le L-glufosinate d'ammonium en un dérivé acétylé non phytotoxique.

(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 portant le gène *pat*.
- (2) Considérant que le vecteur de transformation pB2/35Sack est un plasmide de 4076 pb, dérivé du vecteur pUC19, comportant
- une bordure droite du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (pTiAch5),
 - un gène synthétique *pat* fusionné au promoteur et au terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur,
 - le gène *bla* codant la bêta-lactamase, dont la séquence a été coupée avant transformation pour éviter son expression ultérieure,
 - une origine de réplication bactérienne ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que le séquençage de l'insertion a été réalisé et que l'analyse des séquences montre que :
- l'insert de 6780 pb comprend deux répétitions complètes de la cassette *pat* séparées par de l'ADN plasmidique où l'on retrouve l'origine de réplication bactérienne, une séquence partielle de 415 pb de la partie 5' du gène *bla* et en orientation inverse, séparée par plus de 500 pb d'origine plasmidique, une autre séquence partielle de 445 pb correspondant à l'extrémité 3' du gène *bla* ;
 - les deux séquences partielles du gène *bla* ne constitue pas un gène *bla* intact ; des analyses de type northern ont permis de vérifier que le gène *bla* ne s'exprime pas dans les feuilles, la tige, les racines ou les graines ;

Considérant que les analyses de type Southern ont été effectuées afin de déterminer la nature, le nombre, l'intégrité des insertions dans le soja A2704-12 et qu'elles montrent que les fragments observés répondant à l'hybridation ont tous la taille attendue, que l'insertion a eu lieu en seul locus et que deux cassettes du gène *pat* ont bien été intégrées dans le génome nucléaire du soja ;

Considérant que le séquençage des bordures 5' et 3' de l'insert a été réalisé et qu'il montre que :

- à l'extrémité 5', un fragment d'ADN chloroplastique de 2510 à 2718 pb a été intégré en même temps que l'insert dans le génome nucléaire du soja ; l'analyse informatique de cette séquence démontre de manière univoque qu'elle appartient bien au génome du soja ; la recherche d'homologies indique que cette séquence correspond à une région située dans l'espace intergénique d'ADN chloroplastique¹ codant pour les ARN 16S-23S ;
- à l'extrémité 3', les 299 pb analysées ne révèlent aucune identité avec des séquences connues ;

Considérant cependant que :

- à l'extrémité 5', en raison de l'insertion d'un fragment d'ADN chloroplastique, aucune information n'étant disponible sur la zone de jonction avec le génome nucléaire, il conviendrait de prolonger le séquençage et l'analyse de la séquence au-delà du fragment chloroplastique d'environ 2700 pb pour déterminer la séquence nucléaire et son rôle éventuel (insertion dans un gène, zone non codante, recherche d'ORF dans cette région) ;
- à l'extrémité 3', il conviendrait de prolonger le séquençage et l'analyse de la séquence pour s'assurer que le fragment de 299 pb ne représente pas un fragment de gène et qu'il correspond bien à une zone non codante ;

¹ la présence d'ADN chloroplastique au lieu d'insertion est souvent observée lorsque la transformation se fait par biolistique

(3) Informations relatives à l'expression des produits de gène

Considérant que les teneurs en protéine PAT mesurées par la méthode ELISA dans différents organes de plantes A2704-12 cultivées en serre, prélevés à différents stades de maturité montrent que :

- dans les feuilles de plantes non traitées au glufosinate, la teneur moyenne est comprise entre 8,4 et 28,2 µg/g de poids frais (stade végétatif V3 à V8) soit 0,010 à 0,035 % de protéine brute ;
- dans les feuilles de plantes traitées au glufosinate, la teneur moyenne est comprise entre 14,3 et 17,9 µg/g de poids frais (stade végétatif V5-6 à V8) ;
- dans les racines (stade végétatif V2 à V4) de plantes non traitées au glufosinate, la teneur moyenne est de 2,23 µg/g de poids frais (0,30-3,69 µg/g poids frais) soit 0,011 % de protéine brute ;
- dans les tiges (stade végétatif V2 à V4) de plantes non traitées au glufosinate, la teneur moyenne est de 7,63 µg/g de poids frais (4,86-10,0 µg/g poids frais), soit 0,021 % de protéine brute ;

Considérant que les teneurs en protéine PAT ont été mesurées par la méthode ELISA dans les graines de plantes de soja A2704-12, traitées et non traitées au glufosinate, cultivées aux Etats-Unis et au Canada en 1996, 1997 et 1999 sur 12 sites différents et que ces teneurs sont comprises entre 0,478 et 2,382 µg/g de poids frais selon les lieux de production et les années mais que, dans chaque site, les différences entre les échantillons traités et non traités au glufosinate ne sont pas significatives ;

Considérant que les analyses informatiques des séquences n'ont pas permis de mettre en évidence des phases de lecture ouvertes (ORF) qui pourraient conduire à des produits de traduction aux deux points d'insertion mais qu'en ce qui concerne le génome nucléaire à l'extrémité 5', ces analyses n'ont été conduites qu'avec le fragment d'ADN chloroplastique inséré en même temps que la construction ;

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

Considérant que l'analyse par ELISA et PCR d'échantillons issus de plantes de 3 générations de soja A2704-12 ou issus de la 8^{ème}, de la 9^{ème} et de la 14^{ème} génération montre que le transgène est co-transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant et que la taille des fragments analysés correspond à la taille des fragments attendus, prouvant la stabilité de cette construction dans les sojas portant l'événement de transformation A2704-12 ;

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

- (7.1-3) Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons de soja génétiquement modifié A2704-12, traités et non traités au glufosinate d'ammonium, et comparée à la composition de la variété parentale de soja A2704 comme témoin, cultivée conjointement avec le soja A2704-12 en 1999 et 2002 sur 9 sites aux Etats-Unis et au Canada (avec 3 répétitions par site) ; cette analyse de composition porte sur la graine crue et sur des produits dérivés (tourteau déshuilé toasté ou non, les protéines isolées, l'huile raffinée et la lécithine) ;

Considérant que pour la graine crue :

- les teneurs en **macro-éléments** (protéines, lipides, glucides, cendres, ADF, NDF) sont comparables, notamment les teneurs en protéines, entre le soja GM traité et non traité à l'herbicide et le témoin. Toutefois, des teneurs significativement supérieures en glucides apparaissent dans le soja GM traité et non traité, sans doute en raison de l'imprécision de la détermination de ce paramètre estimé par différence ;
- les teneurs en **acides aminés** sont remarquablement cohérentes entre les sites et l'équivalence est bien affirmée entre le soja témoin et GM. La somme des 10 acides aminés indispensables est toujours légèrement supérieure (mais non statistiquement significative) dans les plantes GM par rapport au témoin à l'exception de la teneur en

proline qui est différente sur un site en Ontario et des teneurs en arginine, isoleucine, leucine et phénylalanine qui sont plus élevées mais non différentes statistiquement entre le témoin et le soja GM dans l'Illinois ;

- les teneurs en **acides gras** montrent également une équivalence bien respectée entre le soja témoin et soja GM traité ou non traité au glufosinate. Toutefois, on observe (dans une seule expérience sur 4) un taux plus élevé de C18 :1 associé à un taux comparativement plus faible de C18 :2, en moyenne dans trois sites en 1998 qui ne se vérifiera pas dans les trois autres expériences. Une variation de la teneur en acide palmitique est observée dans un seul échantillon au Nebraska. Enfin, des différences en acide C16 :1 (palmitoléique), en C20 :1 (gadoléique) ou en acide érucique (C22 :1) observées pour des teneurs moyennes voisines de 0,2 % des acides gras sont sans signification biologique ;
- les teneurs en **minéraux** sont très imparfaitement renseignées notamment sur le potassium et les oligo-éléments (Mg, Mn, Cu, Zn, ...) et des incohérences sont observées pour les teneurs en calcium et en fer. En raison de différences entre les protocoles, les données disponibles ne permettent pas d'établir une comparaison entre le soja témoin et GM ;
- concernant les teneurs en **vitamines**, bien qu'il s'agisse de constituants mineurs, les données disponibles sont très insuffisantes, notamment les teneurs en acide folique et en vitamine E, et ne sont pas interprétables ;
- concernant les teneurs en facteurs antinutritionnels, on note des différences statistiques sporadiques pour les teneurs en raffinose et en lectines malgré la mise en œuvre de deux techniques de dosages ; pour les facteurs antitryptiques, les différences observées entre le témoin et le soja GM ne sont pas statistiquement différentes et restent inférieures aux valeurs de la littérature ;
- la comparaison des teneurs en **isoflavones** (daïdzéine totale, genistéine totale et isoflavones totales) montre l'équivalence entre le soja témoin et GM ;

Considérant que pour les produits dérivés, dont les analyses ne portent que sur le soja témoin et le soja GM non traité par le glufosinate, :

- dans le cas du **tourteau déshuilé toasté ou non**, les teneurs en macroéléments (protéines) sont identiques et les teneurs en acides aminés sont remarquablement cohérentes entre le témoin et le soja GM, confirmant les résultats observés dans la graine ; les teneurs en daïdzéine totale, genistéine totale et isoflavones totales sont équivalentes entre le soja témoin et GM ; les teneurs en lectines diffèrent significativement au détriment du soja GM pour les tourteaux toastés mais vu les discordances entre méthodes, il n'y a pas lieu de conclure sur ce critère ; les teneurs en facteurs antitryptiques apparaissent également significativement différentes dans la 1^{ère} étude, non confirmé par la deuxième étude ;
- dans le cas des **protéines isolées de soja**, les données montrent des teneurs en protéines brutes et en acides aminés comparables entre le témoin et le soja GM, en plein accord avec les données équivalentes sur la graine et les tourteaux ;
- dans le cas de l'**huile raffinée**, en considérant les 10 principaux acides gras, les teneurs sont comparables entre les produits issus du soja témoin et ceux du soja GM, en particulier, aucune différence n'apparaît pour ce qui concerne les teneurs en C18 :1 et C18 :2 signalées pour la graine crue dans une expérience sur 4 ;
- dans le cas des **phospholipides de la lécithine**, la comparaison des teneurs en différents phospholipides de la lécithine (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidyl-inositol et acide phosphatidique) extraits lors de la trituration montre une très grande similitude entre les composants dosés sur les produits issus du soja témoin et du soja GM ;

(7.4) **Caractéristiques agronomiques**

Considérant que les diverses caractéristiques agronomiques analysées (notamment date de floraison, de maturité, hauteur et port de la graine) du soja témoin A-2704, comparées à celles du soja GM A-2704-12, ne sont pas affectées par la modification génétique ni par le traitement herbicide ;

(7.6) **Effets des traitements technologiques**

Considérant que l'ensemble des procédés de traitement appliqués au soja, notamment le chauffage à température supérieure à 100 °C permet d'éliminer les facteurs antitrypsiques mais est sans effet sur les lectines et les isoflavones ;

Considérant que les dosages de la protéine PAT réalisés par la technique ELISA dans la graine de soja et dans ses produits dérivés montrent qu'en raison de sa sensibilité thermique, la protéine PAT est présente en très faible quantité dans les coproduits, plus spécialement dans les isolats de protéines (tableau) ;

Tableau : Teneur en protéine PAT (exprimée en µg/g de poids frais) dans la graine de soja A2704-12 et ses coproduits et effet des traitements technologiques

Origine, date des échantillons	Produit de soja A2704-12 traité ou non par le glufosinate	Protéine PAT (µg/g poids frais)	Protéine PAT en % de protéines totales
Iowa, 1996	graine coque tourteau déshuilé, toasté ou non isolat de protéines huile raffinée	0,573 0,380 non détecté non détecté non détecté	0,00016 0,00030
Illinois et Nebraska, 1996	graine	1,516-1,934 0,816-1,078	
Illinois, 1999	graine (non traité/traité) coque (non traité/traité) tourteau déshuilé (non traité/traité) isolat de protéines (non traité/traité)	2,138/1,948 1,596/1,653 0,011/0,005 0,009/0,009	0,00050/0,00056 0,00081/0,00092
Illinois, Nebraska, Wisconsin, Ontario, 1999	graine (non traité/traité)	0,518-1,173	

7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) Considérant que les résultats d'une étude de toxicité aiguë, réalisée chez des souris à qui une dose unique de la protéine PAT (10 mg/kg p.c.) a été administrée par voie intraveineuse, n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes ni de mortalité après 15 j d'observations ; il convient de noter que de nombreuses études de toxicité aiguë ont été réalisées par voie orale avec la protéine PAT et qu'il n'a jamais été mis en évidence d'effet néfaste (dose sans effet supérieure à 5000 mg/kg p.c.) ;

Considérant que l'équivalence structurale et fonctionnelle de la protéine PAT extraite du soja A2704-12 et la protéine PAT extraite d'E.coli a été vérifiée par analyse SDS-Page et Western blot, et qu'elle n'est pas glycosylée ;

Considérant que la protéine PAT :

- perd toute activité enzymatique après chauffage à 50° C mais conserve sa structure après 60 minutes à 90 °C (migration électrophorétique non affectée par le chauffage),
- est dégradée *in vitro* en milieu gastrique simulé (en présence de pepsine, à pH 2) et en fluide intestinal simulé (en présence de pancréatine à pH 7,5) en moins de 30 secondes ;
- ne présente pas d'homologie de structure avec des protéines répertoriées dans les banques de données, connues pour être toxiques, immunotoxiques ou avoir une activité pharmacologique ;

(7.8.4) Considérant cependant qu'étant donné la particularité du soja, connu pour contenir de nombreux facteurs antinutritionnels, il serait nécessaire de disposer d'une étude de toxicité subchronique (90 j) chez le rat nourri avec des produits issus du soja A2704-12 pour exclure la survenue d'effets toxiques inattendus liés à la modification génétique ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que la comparaison de la séquence des acides aminés (sur la base de recherche d'identité de séquences protéiques portant sur 8 acides aminés consécutifs)

de la protéine PAT exprimée dans le soja A2704-12 avec des séquences de protéines connues pour être allergènes et répertoriées dans 7 bases de données ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ;

Considérant qu'il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et digestion *in vitro*, comparaison de séquences, absence de sites de glycosylation) ne suffisent pas, pour autant, pour 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 ;

Considérant cependant qu'afin de vérifier que le contenu en allergène du soja GM n'a pas varié par rapport à celui du soja parental, un test d'allergénicité a été réalisé à partir de 16 sérums provenant de patients volontaires humains allergiques aux protéines de soja ; les résultats montrent que le pourcentage de sensibilisation est identique entre le soja parental A2704 et le soja GM A2704-12, permettant d'estimer qu'il est peu probable que survienne une réaction allergique qui serait directement liée à l'introduction du transgène ;

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée en 1997 chez le poulet (6 animaux par sexe et 6 répétitions) nourri pendant 15 jours avec un régime contenant 18 % de graine de soja GM A2704-12 ou témoin A2704 traité par chauffage 8 minutes à 115 °C afin d'éliminer les facteurs antitryptiques ;

Considérant que la composition de l'aliment (énergie métabolique, protéines brutes, méthionine, lysine et phosphore) a été seulement donnée après calcul sans dosage chimique ;

Considérant qu'on n'observe aucune différence entre le soja témoin et le soja GM pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux mais qu'aucune donnée n'est disponible sur les caractéristiques de la carcasse, notamment le rendement à l'abattage et la qualité de la viande,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que :

- les données relatives à la construction génétique devraient être complétées, notamment l'analyse des séquences bordures de l'insertion, de la façon suivante :
 - en raison de la présence d'un fragment d'origine chloroplastique à l'extrémité 5' de l'insertion, déterminer la séquence à la jonction entre l'extrémité 5' de ce fragment chloroplastique et le génome du soja et réaliser sur cette région une analyse informatique des séquences, ce qui permettrait de savoir si des ARN ou des protéines potentiels de fusion sont possibles ou non ;
 - prolonger le séquençage et l'analyse de la séquence du génome nucléaire à l'extrémité 3' pour s'assurer que le fragment de 299 pb ne représente pas un fragment de gène et qu'il correspond bien à une zone non codante ;
 - analyser la séquence reconstituée du génome nucléaire du soja de part et d'autre de l'insertion afin de déterminer un rôle éventuel de l'ADN nucléaire au lieu de l'insertion ;
- l'équivalence en substance ne peut être garantie dans la mesure où la composition en minéraux n'est pas établie et/ou les dosages de lectines, notamment dans le tourteau déshuilé, ne permettent pas de conclure en raison de discordances entre les méthodes d'analyses ;
- compte tenu de l'importance des facteurs antinutritionnels dans le soja, l'évaluation de la toxicité fondée sur une étude de toxicité aiguë de la protéine PAT par voie intraveineuse ne peut pas être considérée comme suffisante ; la réalisation d'une étude de toxicité à dose répétée de 90 jours chez le rat nourri avec un produit dérivé du soja A2704-12 traité et non

traité par le glufosinate (tourteau déshuilé toasté, isolats ou concentrats de protéines) est nécessaire pour compléter l'étude d'effets toxiques potentiels de ce soja ;

- compte tenu de la durée réduite de l'étude d'alimentarité sur le poulet (15 jours au lieu de 42 jours habituellement) et du nombre limité de paramètres analysés, les résultats de cette étude ne permettent pas de s'assurer de l'alimentarité du soja A2704-12 ; la réalisation d'une nouvelle étude sur animal cible conformément aux bonnes pratiques² devrait permettre d'apporter des éléments d'évaluation nécessaires.

En conséquence, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les données disponibles ne permettent pas d'évaluer la sécurité sanitaire du soja génétiquement modifié A2704-12 et de ses produits dérivés destinés à l'alimentation humaine et animale.

Pascale BRIAND

² Best practices for the conduct of animal studies to evaluate crops genetically modified for input traits, ILSI, 2003