

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 5 juin 2019

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 GMB151
développé pour être tolérant à certains herbicides et résistant à certains nématodes,
pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine
et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2018-153)**

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 12 mars 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du soja génétiquement modifié GMB151 développé pour être tolérant à certains herbicides et résistant à certains nématodes, pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-NL-2018-153).

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/European Food Safety Authority (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 États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

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 9 mai 2019 sur la base de rapports initiaux rédigés par sept rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides du panel GMO de l'EFSA (2006, 2011) ainsi que 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 GT

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

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le soja est une légumineuse cultivée dans les régions chaudes à semi-tropicales. En 2016, les cinq premiers pays producteurs de soja étaient les USA, le Brésil, l'Argentine, l'Inde et la Chine qui représentaient environ 89 % de la production mondiale. La production mondiale en 2016 était de 334,89 millions de tonnes métriques (FAOStat¹). En se basant sur les données FAOStat, les sojas étaient cultivés sur 121,5 millions d'hectares dont 77 % étaient génétiquement modifiés (ISAAA², 2017).

La graine de soja renferme environ 40 % de protéines et 20 % d'huile (en pourcentage de matière sèche). Les produits destinés à l'alimentation animale sont la graine après traitement à la chaleur adapté, l'huile ou le tourteau délipidé et toasté. Les produits destinés à l'alimentation humaine sont très divers : farine, protéines (isolats et concentrats), huile, margarine, lécithines (émulsifiants utilisés dans de nombreux produits alimentaires). Cependant, la graine de soja contient des substances antinutritionnelles [facteurs antitrypsiques, lectines, acide phytique, carbohydrates de bas poids moléculaire (stachyose et raffinose)] et des protéines identifiées comme allergènes.

Le soja GMB151 est issu d'une variété de l'espèce *Glycine max* qui a été génétiquement modifiée afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *hppdPf-4Pa* et *Cry14Ab-1.b* codant respectivement une 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase modifiée (protéine HPPD-4) et une delta-endotoxine, membre de la famille des protéines Cry (protéine Cry14Ab-1). La protéine HPPD-4 confère à la plante la tolérance aux inhibiteurs d'HPPD (ex : isoxaflutole) et la protéine Cry14Ab-1, la résistance à certains nématodes.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du soja GMB151. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce soja venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

² International service for the acquisition of agri-biotech applications

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur la variété de *Glycine max* non transgénique Thorne.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des explants de soja.

Des explants de soja ont été prélevés et co-cultivés avec la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, portant le vecteur pSZ8832 ainsi que le plasmide auxiliaire (helper Ti plasmid) pAL4404. pAL4404 possède les gènes de virulence d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules de la plante.

Après cette co-culture, les explants ont été transférés sur milieu sélectif contenant de la ticarcilline (élimination des *A. tumefaciens* résiduelles) et du tembotrione, herbicide inhibiteur d'HPPD (sélection des cellules transformées). Les pousses ont ensuite été transférées successivement sur différents milieux pour aboutir à la différenciation de plantules. Enfin, ces plantules transformées ont été transférées en serre.

Le plasmide pSZ8832 utilisé pour la transformation porte les deux cassettes d'expression des gènes *cry14Ab-1.b* et *hppdPf-4Pa* entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T. Les données de séquence de ce plasmide ne sont pas fournies.

La cassette d'expression du gène *cry14Ab-1.b* contient une séquence codante d'une delta-endotoxine de *Bacillus thuringiensis*. La protéine exprimée Cry14Ab-1 présente une activité nématocide contre *Heterodera glycines* (Soybean Cyst Nematode, SCN). Le gène *cry14Ab-1.b* dont la séquence codante a été optimisée pour l'expression en cellule végétale, est placé sous le contrôle de séquences promotrices du gène de l'ubiquitine 10 d'*Arabidopsis thaliana* et de la région 3' non codante du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur CMV (Cauliflower Mosaic Virus).

La cassette d'expression du gène *hppdPf-4Pa* contient une séquence codante de la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase de la souche A32 de *Pseudomonas fluorescens* contenant 4 substitutions d'acides aminés : un acide glutamique en proline en position 335, une glycine en tryptophane en position 336, une lysine en alanine en position 339 et une alanine en glutamine en position 340. Grâce à ces 4 modifications, la protéine HPPD-4 présente une moindre affinité de liaison à l'herbicide permettant à l'activité enzymatique d'être maintenue ce qui confère à la plante la tolérance aux inhibiteurs d'HPPD. Le gène *hppdPf-4Pa* est placé sous le contrôle :

- d'une duplication en tandem des séquences promotrices/activatrices du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (P2x35S),
- de la séquence leader 5' (= Cap-Independent Regulatory Element ou CIRE) du virus de la gravure du tabac TEV (Tobacco Etch Virus),
- d'une séquence TPotpY-1Pf permettant la traduction d'un peptide d'adressage au chloroplaste issu des gènes de la petite sous-unité de la RuBisCo³ du maïs et du tournesol
- et de la région 3' non codante du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

Le GT « Biotechnologie » regrette le manque d'informations précises au sujet des séquences P2x35S en amont du gène *hppdPf-4Pa*.

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du soja GMB151 (génération T2) ont été caractérisés par séquençage de nouvelle génération et analyse des

³ Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase oxygénase

séquences de jonction (NGS/JSA). L'analyse des résultats obtenus montre une insertion unique de l'ADN-T comprenant la cassette d'expression complète *cry14Ab-1.b* et la cassette d'expression *hppdPf-4Pa* déléetée d'une partie de l'extrémité 5' de la duplication des séquences promotrices/activatrices du gène 35S (P2x35S).

Une séquence de 39 pb se retrouve insérée au niveau de l'extrémité 3' entre l'ADN-T et le génome du soja. Cette séquence présente une identité de 21 pb avec l'origine de répliation pSV1 du plasmide pSZ8832 et de 17 pb avec la région 3' flanquante du génome de soja.

Les amplifications par PCR suivies du séquençage des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (environ 1000 pb de chaque côté) pour le soja GMB151 et son témoin isogénique Thorne mettent en évidence une délétion de 63 pb au site d'insertion de l'ADN-T et un polymorphisme d'un nucléotide dans la région génomique 3' du soja GMB151.

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des jonctions et de l'ADN-T ne mettent en évidence aucune identité totale, globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergéniques connues (2018). Ces analyses bioinformatiques localisent l'insertion de l'ADN-T sur le chromosome 7, dans la région 3' non traduite d'un gène codant une protéine BAP1-like (BON1-associated protein 1-like), protéine qui n'est pas caractérisée chez le soja. Le GT « Biotechnologie » souhaite que le pétitionnaire vérifie si cette protéine est exprimée dans le soja et dans ce cas, si son niveau d'expression n'est pas modifié par la transformation génétique.

Les teneurs en protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 dans divers tissus (feuilles, racines, fleurs, fourrage, graines et plantes entières) prélevés à différents stades de développement de la plante ont été mesurées à l'aide de test ELISA sur la génération T6. Les plantes de soja GMB151 ont été cultivées sur 3 sites aux USA en 2016 avec ou sans traitement avec l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD). Les concentrations des protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 sont quantifiables dans tous les tissus analysés de soja GMB151 traité ou non avec l'isoxaflutole. Les concentrations moyennes les plus élevées pour les deux protéines d'intérêt sont mesurées dans des feuilles de jeunes plantes (191,99 µg/g de matière sèche pour la protéine Cry14Ab-1 et 430,04 µg/g de matière sèche pour la protéine HPPD-4). Les concentrations ont été mesurées dans les graines et le fourrage à l'origine des produits consommés en alimentation animale et humaine. Dans les graines de soja GMB151 non traité avec l'isoxaflutole, la concentration moyenne de protéine Cry14Ab-1 est de 95,91 (± 43,11) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD-4 est de 4,46 (± 2,90) µg/g de matière sèche. Dans les graines de soja GMB151 traité avec l'isoxaflutole, la concentration moyenne de protéine Cry14Ab-1 est de 83,14 (± 37,69) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD-4 est de 4,45 (± 3,57) µg/g de matière sèche. Dans le fourrage de soja GMB151 non traité avec l'isoxaflutole, la concentration moyenne de protéine Cry14Ab-1 est de 51,34 (± 9,25) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD-4 est de 120,18 (± 42,47) µg/g de matière sèche. Dans le fourrage de soja GMB151 traité avec l'isoxaflutole, la concentration moyenne de protéine Cry14Ab-1 est de 48,72 (± 9,38) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD-4 est de 129,03 (± 45,32) µg/g de matière sèche. Ces résultats ne mettent pas en évidence un effet du traitement herbicide sur le niveau d'expression des protéines d'intérêt.

L'analyse de ségrégation de l'insert réalisée par PCR sur 5 générations (F2, BC1F2 et BC2F2 du parent 4, et F2 et BC2F2 du parent 5) permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. La stabilité génétique et phénotypique du locus GM du soja GMB151 a été confirmée au sein des générations T2, T4, T5, T6 et BC2F3, respectivement, par séquençage NGS et détection de l'expression des protéines d'intérêt.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du soja GMB151 permettent de caractériser ce soja. En l'absence des données d'expression de la protéine BAP-1 like identifiée par l'analyse bioinformatique, le GT « Biotechnologie » ne peut se prononcer sur le risque lié à l'utilisation de ce soja en alimentation humaine ou animale. Il regrette aussi l'absence d'informations précises concernant les séquences de régulation de l'expression du gène *hppdPf-4Pa* (P2x35S) et l'absence de la séquence complète du plasmide pSZ8832.

II.1.3. Evaluation comparative

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Le soja GMB151 est comparé à son équivalent non transgénique Thorne. Au total, neuf variétés commerciales conventionnelles non transgéniques ont été utilisées comme témoins dans les différents essais réalisés en 2017.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le soja GMB151, la variété témoin isogénique et les variétés commerciales (3 variétés par site) ont été cultivés sur 12 sites en 2017. Un site a ensuite été exclu en raison d'inondation. Ces sites répartis sur huit Etats sont indiqués comme représentatifs de la production de soja aux USA. Chaque modalité (variété témoin, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Pour la variété génétiquement modifiée, deux modalités sont réalisées : soit les plantes subissent les mêmes traitements que les variétés témoins, soit elles reçoivent en plus un traitement avec l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD). Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011).

Des échantillons ont été récoltés pour les 11 sites d'essais. Les analyses phénotypiques et agronomiques ont été réalisées sur tous les sites mais les analyses de composition uniquement sur les échantillons de 8 sites. L'explication du pétitionnaire pour l'exclusion des 3 autres sites est insuffisante. Une sélection des sites réalisée *a posteriori* est sujette à caution. Le GT « Biotechnologie » considère qu'en l'absence de raison d'exclusion validée, les échantillons de tous les essais au champ devraient être analysés et exploités pour l'évaluation comparative. Il conviendrait donc de mettre en œuvre les données issues des 11 sites d'essais ou de justifier les raisons d'exclusion des 3 sites.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) réalisées avec un modèle linéaire mixte incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du soja GMB151 traité ou non avec l'herbicide d'intérêt, de la variété témoin ou des variétés commerciales de référence),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Le soja GMB151 est comparé à la variété témoin isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les variables en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de composition a été réalisée sur la graine entière et sur le fourrage. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2015). Le GT « Biotechnologie » estime que cette analyse est complète.

Une analyse des métabolites de la voie métabolique de la tyrosine a été ajoutée par le pétitionnaire, l'activité enzymatique de la protéine HPPD-4 pouvant intervenir dans ce métabolisme.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Soixante-six paramètres ont été mesurés répartis en 15 pour le fourrage et 51 pour la graine. En l'absence de justification de l'exclusion de 3 sites d'expérimentation, le GT « Biotechnologie » ne se prononce pas sur l'analyse de composition du soja GMB151.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 10 paramètres.

Le soja GMB151 apparaît équivalent aux variétés commerciales sur le plan agronomique et phénotypique, à l'exception de la tolérance aux inhibiteurs d'HPPD et de la résistance à certains nématodes.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Les teneurs en protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 ont été mesurées dans les graines, les tourteaux toastés, l'huile raffinée, décolorée et désodorisée (RBD oil), les isolats de protéines et les cosses issus de soja GMB151 traité ou non avec l'herbicide d'intérêt. La protéine HPPD-4 est mesurable dans les graines, les isolats de protéines et les gousses et la protéine Cry14Ab-1 est mesurable uniquement dans les graines et les gousses. Le traitement du soja par l'herbicide n'a pas d'effet sur les concentrations mesurées des deux protéines dans les produits.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, le GT « Biotechnologie » ne peut pas conclure en ce qui concerne l'évaluation comparative du soja GMB151.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Les protéines Cry sont des delta-endotoxines activées dans l'environnement alcalin de l'intestin des insectes, où elles se lient à des récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, conduisant à la formation de pores et à la lyse cellulaire. L'absence de toxicité pour les mammifères s'explique par leur dégradation dans le milieu acide stomacal et l'absence de récepteurs.

La famille des protéines HPPD existe dans de nombreux organismes végétaux et micro-organismes consommés par l'Homme, ce qui leur apporte un historique d'utilisation sûre en alimentation humaine et animale.

Les protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 ne présentent pas d'identité de séquences totale, globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2018). Elles sont présentes en faible quantité dans les graines du soja GMB151 qu'il soit traité ou non avec un inhibiteur d'HPPD et ne sont pas glycosylées. Elles montrent une faible résistance à la dégradation pepsique (test de digestion gastrique simulée *in vitro*). La protéine HPPD-4 montre une faible résistance à la digestion trypsique (test de digestion intestinale simulée *in vitro*) contrairement à la protéine Cry14Ab-1 qui n'est que partiellement digérée après 1h.

Les protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 commencent à être dégradées à partir de 55 °C pour ne plus être détectées à partir de 75 °C. La protéine HPPD-4 est inactivée à partir de 55 °C et la protéine Cry14Ab-1 à partir de 75 °C.

Le pétitionnaire présente une étude de toxicité orale par administration répétée pendant 28 jours pour chacune des protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4, selon la ligne directrice OCDE 407 (2008) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

En 2016, une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris CD1 (10 souris par sexe) a été réalisée par gavage à la dose de 1000 mg/kg p.c./ jour de la protéine bactérienne Cry14Ab-1. La protéine Cry14Ab-1 utilisée a été extraite d'une souche génétiquement modifiée de *Bacillus thuringiensis*. Son équivalence structurale et fonctionnelle avec la protéine Cry14Ab-1 synthétisée par le soja GMB151 a été démontrée. Les données de cette étude ne mettent pas en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine Cry14Ab-1.

En 2015, une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris C57BL/6J (10 souris par sexe) a été réalisée par gavage à la dose de 1000 mg/kg p.c./ jour de la protéine HPPD-4 produite avec une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli*, dont l'équivalence structurale et fonctionnelle a été démontrée avec la protéine HPPD-4 synthétisée par le soja GMB151. Les données de cette étude ne mettent pas en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine HPPD-4. Toutefois, le GT « Biotechnologie » considère que la fourniture des données historiques du centre investigateur est indispensable pour réaliser l'expertise des résultats de cette étude de toxicité et pouvoir conclure sur le potentiel toxique de la protéine HPPD-4.

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4. Ce point devrait être argumenté.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

Le pétitionnaire ne fournit pas d'information sur la présence éventuelle de nouveaux constituants.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux dérivés du soja GMB151.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Une étude de toxicité sub-chronique pendant 90 jours chez le rongeur a été menée en 2018 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données brutes sous format électronique et le programme de calcul ne sont pas fournis.

Trois groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Sprague-Dawley (CrI :CD) ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 30 % (p/p) de tourteau toasté, fabriqué à partir des graines de soja de la variété génétiquement modifiée GMB151,
- 30 % (p/p) de tourteau toasté, fabriqué à partir des graines de soja de la variété de référence non génétiquement modifiée, Thorne,
- 30 % (p/p) de tourteau toasté, fabriqué à partir des graines de soja d'une variété commerciale non génétiquement modifiée E3494.

Le soja GMB151 utilisé dans cette étude a été traité avec l'herbicide d'intérêt, l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD). Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux différents groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en

contaminants. Le Règlement d'exécution (UE) n°503/2013, en vigueur pour ce dossier, précise que pour les études de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur, « *Il y a lieu d'utiliser, en principe, au moins deux doses d'essai et un échantillon de contrôle négatif. La dose la plus élevée doit être la dose maximale qu'il est possible d'atteindre sans entraîner de déséquilibre nutritionnel ; la dose la plus faible doit toujours contenir une quantité de la denrée alimentaire et/ou de l'aliment pour animaux étudiés supérieure à l'apport attendu chez l'Homme ou l'animal cible. L'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié analysé doit être en rapport avec le produit destiné à être consommé.* » Or, le pétitionnaire a choisi une dose d'incorporation unique de 30 % (p/p) de tourteau toasté. Le GT « Biotechnologie » considère que cette dose correspond à la dose forte pouvant être testée. En revanche, il estime qu'une deuxième dose d'incorporation de tourteau toasté est nécessaire pour évaluer la sécurité du soja.

Les données individuelles de l'étude sont présentées. Le pétitionnaire devrait indiquer clairement si les données historiques fournies proviennent bien uniquement du centre investigateur et non de l'ensemble des centres d'études du prestataire.

Le GT « Biotechnologie » considère que le calcul de puissance n'est pas valide. En effet, ce calcul n'est effectué que pour neuf paramètres et les tailles d'effets choisies par le pétitionnaire sans qu'il les justifie (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine) ne sont pas considérées comme appropriées. Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

L'évaluation de la sécurité de la protéine Cry14Ab-1 ne met pas en évidence d'éléments permettant de conclure qu'elle a un effet toxique sur la santé humaine et animale. Concernant la protéine HPPD-4, en l'absence des données historiques du centre investigateur ayant conduit l'étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris, il n'est pas possible de conclure complètement sur la sécurité de cette protéine.

Le GT « Biotechnologie » considère qu'une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur selon les exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 est nécessaire pour renseigner la sécurité du soja GMB151. Elle doit mettre en œuvre deux doses d'incorporation d'un aliment issu du soja GMB151 traité avec un inhibiteur d'HPPD. Afin de documenter la sécurité de l'huile de soja, cet aliment devrait contenir une fraction lipidique, présente en trop faible quantité dans les tourteaux de soja.

Une justification biologique des tailles d'effet choisies par le pétitionnaire pour les différents paramètres est nécessaire afin de pouvoir valider le calcul de puissance. De plus, le pétitionnaire devrait confirmer que les données historiques utilisées sont celles du centre investigateur.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du soja GMB151 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s)

Le potentiel allergénique des protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 exprimées dans le soja transgénique GMB151 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2011), à savoir :

- l'innocuité de la source des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée,
- l'absence d'identités globales et locales avec les allergènes d'une banque,
- la dégradation des protéines exprimées par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées,
- la thermosensibilité des protéines exprimées,

- la faible quantité de protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée.

La protéine Cry14Ab1 est une delta-endotoxine à activité nématocide du groupe des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* est utilisé depuis plusieurs décades comme pesticide bio-organique et se retrouve dans beaucoup de légumes commercialisés et éventuellement dans des eaux de boisson, sans pour autant provoquer de réactions allergiques. La séquence codant la protéine HPPD-4 est dérivée d'un gène de 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase de la souche A32 de *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* est présente dans l'environnement (air, eau, sol) et n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme.

Les protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 exprimées dans le soja GMB151 ne présentent pas d'identités globales ou locales avec les allergènes des banques COMPARE (version 2017) et AllergenOnline (version 2019), ni avec des toxines avérées ou avec les peptides immunotoxiques de la maladie coéliqua. Les protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 n'offrent qu'une faible résistance à la protéolyse digestive gastrique en conditions simulées *in vitro*. La protéine HPPD-4 montre une faible résistance à la digestion trypsique (test de digestion intestinale simulée *in vitro*) contrairement à la protéine Cry14Ab-1 qui n'est que partiellement digérée après 1h. Elles n'offrent qu'une faible résistance à la dénaturation thermique aux températures supérieures à 55 °C. De plus, les résultats des dosages ELISA à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques montrent que les deux protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 sont exprimées à des taux faibles dans les graines et le fourrage que le soja soit traité ou non avec l'herbicide d'intérêt.

Le pétitionnaire n'évoque pas le problème du caractère adjuvant des protéines Cry discuté dans diverses publications. Le GT « Biotechnologie » a examiné deux publications divergentes récentes portant sur la recherche de l'activité immunogène, allergique ou adjuvante de la toxine Cry1Ab (Andreassen *et al.*, 2015) et de la toxine Cry1Ac (Santos-Vigil *et al.*, 2018). En conclusion du rapport de Parenti *et al.* (2019) : "*The publication by Santos-Vigil et al. (2018) does not bring new elements that would lead the EFSA GMO Panel to reconsider the outcome of its previous scientific opinions on genetically modified crops with Cry1Ac. Therefore, EFSA considers that the previous risk assessment conclusions on GM crops with Cry1Ac remain valid and applicable.*", le panel GMO de l'EFSA considère que les résultats rapportés dans la publication de Santos-Vigil *et al.* sur Cry1Ac, ne remettent pas en cause l'avis de l'EFSA qui estime que la teneur en toxines Cry dans les PGM est insuffisante pour déclencher un effet adjuvant et provoquer une réaction allergique. Cette position rejoint les conclusions de Joshi *et al.* (2016) sur l'étude critique des résultats présentés dans les publications faisant état d'un pouvoir adjuvant des protéines Cry, qui conclut qu'en raison de leur taux d'expression très faible dans les PGM « *il est peu probable que les protéines Cry puissent fonctionner comme des adjuvants* ».

Sans nier la possibilité que des toxines Cry puissent avoir un effet adjuvant chez l'Homme, le GT « Biotechnologie » estime que la teneur en protéine Cry14Ab1 présente dans le soja GMB151 semble insuffisante pour déclencher un effet adjuvant et provoquer une réaction allergique.

Les deux protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 exprimées dans le soja GMB151 satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA et peuvent donc être considérées comme étant peu allergéniques.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

Le soja est inscrit dans la liste des allergènes à étiquetage obligatoire (directive 2003/89/CE). De nombreux allergènes ont été identifiés dans les graines de soja et certains d'entre eux sont des allergènes majeurs (allergènes dont les IgE correspondantes sont présentes chez plus de la moitié des patients allergiques au soja).

Dans le cas où la plante (soja) est elle-même un allergène reconnu, le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 recommande de procéder à une analyse de l'allergénicité de la plante génétiquement

modifiée et de son comparateur. L'objectif est de détecter une éventuelle modification de l'allergénicité induite par l'introduction du ou des transgène(s) dans la plante génétiquement modifiée (augmentation de la synthèse de certains allergènes par exemple).

Le dosage des principaux allergènes des graines de soja a été inclus dans l'analyse comparative du soja GMB151 effectuée par le pétitionnaire : il s'agit des allergènes Gly m 1 (protéine hydrophobe de la graine HSP), Gly m 3 (profiline), Gly m 4 (protéine PR-10 Bet v 1-like), Gly m 5 (vicilline, 7S globuline), Gly m 6 (légumine, 11S globuline), Gly m 7 (protéine biotinylée spécifique de la graine, SSBP), Gly m 8 (albumine 2S), des inhibiteurs trypsiques de Kunitz 1 et 3, et des allergènes Gly m Bd 28k et Gly m Bd 30k. Les échantillons sont issus du même dispositif expérimental et les analyses statistiques ont été réalisées de la même manière que pour l'évaluation comparative. Les résultats de l'analyse comparative des allergènes endogènes du soja GMB151 ne permettent pas de conclure à une non équivalence avec les variétés de soja conventionnelles.

Aucune des informations disponibles ne laisse supposer que le soja GMB151 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de soja non génétiquement modifiées. Dans ces conditions, le pétitionnaire n'a pas jugé nécessaire, à juste titre, d'effectuer des tests utilisant les IgE spécifiques de patients allergiques.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des données et arguments fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des protéines Cry14Ab1 et HPPD-4 exprimées dans le soja GMB151 peut être considéré comme faible. Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les graines et le fourrage du soja GMB151 et n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, aucune des informations disponibles ne laisse supposer que le soja GMB151 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de soja non génétiquement modifiées.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le soja GMB151 et les variétés de soja conventionnelles.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prédiction de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au soja GMB151 pour l'animal et l'Homme.

L'estimation de la consommation journalière des protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 chez l'animal est fondée sur les données de l'OCDE (2013) relatives à la consommation de soja par les animaux d'élevage et un scénario du "pire des cas". Dans ces conditions, les apports journaliers les plus élevés sont obtenus chez les bovins à viande d'Australie en considérant une alimentation complète avec du fourrage de soja GMB151 (40 g/kg de poids corporel/jour). Ce scénario correspondrait à une ingestion de 2676 µg/kg p.c./jour de protéine Cry14Ab-1 et de 7851 µg/kg p.c./jour de protéine HPPD-4.

L'estimation de la consommation maximale des protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 par l'Homme est fondée sur l'utilisation de l'EFSA European Comprehensive Food Consumption Database⁴. Dans un scénario du "pire des cas", les moyennes des expositions chroniques alimentaires les plus élevées pour les protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 serait respectivement de :

- 18,59 et 1 µg/kg p.c./j pour la catégorie « enfants en bas âge » lorsque le calcul est réalisé avec les données de consommation belges pour les 12 denrées alimentaires contenant du soja présentes dans la base,
- 139,73 et 7,5 µg/kg p.c./j pour la catégorie « enfants en bas âge » lorsque le calcul est réalisé avec les données de consommation belges pour les forts consommateurs (95^{ème} percentile), liées à des fortes consommations de boissons à base de soja.

II.3 Caractérisation des risques

Le pétitionnaire présente une caractérisation des risques qualitative basée sur les conclusions qu'il formule à partir des informations et des données des différentes études réalisées pour ce dossier. En l'absence d'études de toxicité et d'alimentarité réalisées sur des animaux de rente, le GT « Biotechnologie » considère que le risque ne peut pas être caractérisé pour ces animaux.

Pour l'Homme, une marge de sécurité pourrait être calculée à partir de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL⁵) pouvant être déduite de l'étude de toxicité orale subchronique chez le rat par administration répétée pendant 90 jours.

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

En l'absence des données d'expression de la protéine BAP-1 like identifiée par l'analyse bioinformatique et des informations concernant les séquences de régulation de l'expression du gène *hppdPf-4Pa* (P2x35S) et la séquence complète du plasmide pSZ8832, le GT « Biotechnologie » ne peut pas conclure sur la caractérisation moléculaire du soja GMB151.

Le potentiel allergénique des protéines Cry14Ab-1 et HPPD-4 paraît faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA ; l'allergénicité du soja GMB151 reste vraisemblablement identique à celle d'un soja conventionnel.

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, il n'est pas possible de conclure sur l'évaluation comparative du soja GMB151, ni sur sa sécurité.

Dans ces conditions, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du soja GMB151.

⁴ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

⁵ No Observed Adverse Effect Level

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable sur la demande d'autorisation de mise sur le marché du soja GMB151 au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003. Cet avis défavorable est fondé sur le caractère incomplet ou imprécis du dossier fourni par le pétitionnaire qui, en l'état, ne répond pas pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013. Sachant que des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier à la demande de l'EFSA, le contenu du présent avis ne préjuge pas des conclusions qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu d'un dossier complété pour répondre pleinement aux exigences du Règlement européen.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

OGM, soja GMB151, tolérance aux inhibiteurs d'HPPD, résistant à certains nématodes, HPPD-4, Cry14Ab-1

GMO, soybean GMB151, tolerance to HPPD inhibitors, resistance to nematodes, HPPD-4, Cry14Ab-1

BIBLIOGRAPHIE

Andreassen M, Bøhn T, Wikmark OG, Van den Berg J, Løvik M, Traavik T, Nygaard UC. 2015. Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and MON810 Cry1Ab-transgenic maize exerts no adjuvant effect after airway exposure. *Scand. J. Immunol.* 81:192-200

Directive 2003/89/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 novembre 2003 modifiant la directive 2000/13/CE en ce qui concerne l'indication des ingrédients présents dans les denrées alimentaires (JO L 308 du 25.11.2003, p. 15-18)

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. 2010. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. The EFSA Journal 2010; 8(1): 1250.

EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." *EFSA Journal* 9(5): 2150, 37 pp.

ISAAA. 2017. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017 : Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years." ISAAA brief N° 53. ISAAA:Ithaca, NY.

Joshi SS, Barnett B, Doerrer NG, Glenn K, Herman RA, Herouet-Guicheney C, Hunst P, Kough J, Ladics GS, McClain S, Papineni S, Poulsen LK, Rasclé JB, Tao AL, van Ree R, Ward J, Bowman CC. 2016 Assessment of potential adjuvancity of Cry proteins. Regul. Toxicol. Pharmacol. 79:149-155.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE. 1998. « Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.

OCDE. 2008. « Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.

OCDE. 2013. "Guidance Document on Residues in Livestock." Series on Pesticides, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

OCDE. 2015. "Soybean (*Glycine max*)." Dans Safety assessment of foods and feeds derived from transgenic crops, Volume 2, Éditions OCDE, Paris.

Parenti M. D., Santoro A., Del Rio A., Franceschi C., 2019. Literature review in support of adjuvancity/immunogenicity assessment of proteins. EFSA supporting publication 2019:EN-1551. 68 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1551

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.

Santos-Vigil KI, Ilhuicatzí-Alvarado D, García-Hernández AI, Herrera-García JS, Moreno-Fierros L. 2018. Study of the allergenic potential of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy. Int. Immunopharmacol. 61, 185-196.

US EPA 2002 - Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency