

Maisons-Alfort, le 6 août 2007

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 MON 89788 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**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 juin 2007 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un soja génétiquement modifié MON 89788 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-2006-36).

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 États-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 12 juillet 2007, 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. Les cultures sont souvent envahies par des graminées et certaines espèces à graines toxiques (*Datura ferox*) dont les graines se retrouvent mélangées à la récolte du soja. Il existe peu d'herbicides spécifiques sans effet sur les légumineuses.

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

Cette demande d'autorisation de mise sur le marché concerne un soja (et produits dérivés) portant l'événement de transformation MON 89788 qui consiste en l'intégration dans le génome nucléaire d'un gène codant une enzyme la CP4 EPSPS (5- enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) tolérante au glyphosate.

Les EPSPS présentes dans les plantes et les bactéries sont en général inhibées par le glyphosate, cette inhibition entraînant l'arrêt de la synthèse des acides aminés aromatiques et, par là, la mort de la plante ou de la bactérie. Dans le soja MON 89788, la

présence dans les chloroplastes d'une EPSPS supplémentaire moins sensible au glyphosate (trouvée dans un isolat d'*Agrobacterium*) permet le maintien de la synthèse d'acides aminés et donc la survie de la plante même soumise à un traitement par l'herbicide.

(C) **Informations relatives à la modification génétique**

(1) Le soja MON 89788 a été obtenu par transformation de tissus méristématiques du cultivar A3244 à l'aide d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* afin d'introduire le gène *cp4 epsps* qui confère la tolérance à un herbicide : le glyphosate. Cette nouvelle technique de transformation permet d'introduire directement le gène dans le germplasm de la lignée élite.

(2) Considérant que l'ADN-T (environ 4300 pb) porté par le vecteur de transformation PV-GMGOX20 (environ 9700 pb) contient la séquence (optimisée dans le contexte végétal) qui code et régule l'expression constitutive de la protéine CP4 EPSPS :

Cassette *ctp2-cp4 epsps* : le gène *cp4 epsps* (origine: *Agrobacterium sp.*) est précédé par la séquence *ctp2* (origine : *Arabidopsis thaliana*) qui code pour un peptide d'adressage dans les chloroplastes. La cassette *ctp2-cp4 epsps* est sous le contrôle d'une part, d'un promoteur chimérique comportant des séquences enhancer du promoteur 35S d'un caulimovirus (le Figwort Mosaic Virus) et du promoteur du gène *Tsf1* d'*A. thaliana* et d'autre part, de la séquence de terminaison T-E9 (séquence 3' non transcrite du gène de la petite sous-unité de la RBPC du pois) ;

(D) **Informations relatives à la plante génétiquement modifiée**

(2) Considérant que des hybridations de type Southern ont été réalisées avec des sondes correspondant aux différentes parties du plasmide vecteur, sur de l'ADN de soja témoin (A3244), de MON 89788 et du plasmide vecteur, hydrolysé par plusieurs endonucléases de restriction, que l'analyse de ces hybridations montre de façon convaincante que MON 89788 contient un seul fragment d'insertion et que ce fragment contient une seule copie issue du plasmide PV-GMGOX20, au niveau d'un seul locus dans le génome du soja ; aucune autre séquence pouvant correspondre à l'ADN du vecteur de transformation PV-GMGOX20 n'a été introduite dans le soja MON 89788 ;

Considérant que les analyses de ségrégation sont conformes aux lois de la génétique mendélienne confirmant que l'insertion chez MON 89788 s'est faite au niveau du noyau et qu'elle n'est pas située dans le génome chloroplastique ou mitochondrial ;

Considérant que la structure de l'insert a été vérifiée par PCR (polymerase-chain reaction) de façon complète avec de l'ADN de soja témoin, de MON 89788 et du plasmide vecteur et que les éléments étaient organisés à l'intérieur de l'insert conformément à l'organisation décrite dans le plasmide PV-GMGOX20 ;

Considérant que le séquençage de l'insert (4303 pb) et des régions bordures en 5' (1103 pb) et 3' (1060 pb) appartenant au génome du soja a été réalisée, confirmant l'intégrité de l'insert ;

Considérant qu'afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence n'a été créée par l'insertion, une étude bioinformatique complète a été réalisée pour rechercher la présence d'ORF (open reading frame) putatives dans les 6 cadres de lecture au niveau des régions de bordures de l'insert ;

Considérant que la comparaison des séquences déduites de ces ORF putatives, pouvant générer un peptide de plus de 8 acides aminés, avec des séquences figurant dans des banques de données publiques¹, n'a pas mis en évidence de similarité significative entre ces peptides putatifs et des séquences connues répertoriées dans ces banques de données sauf une séquence de 8 acides aminés ; cette séquence, bien qu'elle ne soit

¹ Banques de données de protéines actives (ALLPEPTIDES), de toxines (TOXINS) et d'allergènes (AD6)

pas encore nommée, n'est pas considérée comme allergène par un panel² de spécialistes des allergies indépendants ;

Considérant que cette analyse montre également qu'aucune séquence prenant son origine dans l'insert et se poursuivant dans le génome du soja n'indique que celui-ci se serait inséré dans une séquence codante chez le soja ;

(3) **Informations relatives à l'expression du produit de gène**

Considérant que l'enzyme EPSPS est ubiquitaire chez les plantes et les microorganismes, que celle qui a été introduite dans le soja provient d'une lignée d'*Agrobacterium* sp. CP4, qu'elle a une structure primaire de 455 acides aminés représentant une masse moléculaire de 47,6 kDa et qu'elle est identique à d'autres CP4 EPSPS introduite dans d'autres sojas et dans des maïs, colza, cotonnier et betterave tolérant au glyphosate ;

Considérant que les teneurs en protéine CP4 EPSPS ont été mesurées par la méthode ELISA dans les feuilles à différents stades de croissance, les graines, les racines et la tige de soja MON 89788 et de soja témoin, prélevées sur des plantes cultivées aux Etats-Unis sur 5 sites en 2005 et en Argentine en 2004-2005 (3 répétitions par site) (tableau 1) ;

Tableau 1 : Teneurs en CP4 EPSPS des principaux tissus en Argentine et aux USA exprimées en µg/g de tissu frais (LD : 0,1 à 0,5 µg/g)

	Teneurs en CP4 EPSP en µg/g de tissu frais (gamme) [écart-type]	
	Argentine 2004/2005	Etats-Unis 2005
Feuille stade 4	90 (48-160) [29]	75 (60-110) [17]
Graine	150 (120-230) [28]	140 (98-170) [20]
Racine	32 (23-43) [5,7]	22 (13-38) [6,0]
Fourrage	73 (56-93) [9,3]	59 (41-94) [14]

Considérant que les teneurs en protéine CP4 EPSPS sont du même ordre de grandeur dans les échantillons prélevés en 2005 aux Etats-Unis et en 2004-2005 en Argentine et que, bien que présente dans toute la plante, elle est préférentiellement retrouvée dans les graines et dans les feuilles ;

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

Considérant que la stabilité génétique de l'insert présent dans MON 89788 a été vérifiée par Southern sur 4 générations (R4 à R7) et que la stabilité phénotypique a été vérifiée par dosage de la protéine CP4 EPSPS sur des plantes de plusieurs générations ;

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

(7.1-3) **Analyse comparative de la composition chimique**

Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons de plantes entières et de graines de soja MON 89788 cultivé sur 5 sites aux Etats-Unis en 2005 (3 répétitions par site), traité au glyphosate et comparée à celle d'échantillons du soja témoin isogénique A3244 et d'échantillons provenant de 12 variétés commerciales de soja traité par des herbicides conventionnels et cultivés conjointement avec le soja MON 89788 ;

² The allergen, gliadin and glutenin sequence database (AD6) was assembled from sequences found on the FAARP (Food Allergy research and Resource Program database) allergen dated January 2006, located at <http://allergenonline.com> (University of Nebraska).

Considérant qu'une seconde étude d'analyse de composition a été réalisée à partir d'échantillons de plantes entières et de graines de soja MON 89788 cultivé sur 5 sites en Argentine en 2004-2005 conjointement avec du soja témoin isogénique A3244 et 12 variétés commerciales de soja ;

Considérant que l'analyse de composition a porté :

- pour la plante entière, sur un ensemble de paramètres fourragers ;
- pour la graine, sur 7 paramètres concernant l'analyse fourragère, humidité, protéines brutes, matière grasse, ADF, NDF, hydrates de carbone et cendres, 18 acides aminés, 22 acides gras dont 14 acides gras mineurs non détectés dans plus de la moitié des échantillons d'Argentine et des Etats-Unis, 5 facteurs antinutritionnels ou toxiques (lectine, acide phytique, inhibiteur de trypsine, raffinose et stachyose), des isoflavones (daidzéine, génistéine et glycitéine), la vitamine E (échantillons Etats-Unis) ;

Considérant que l'analyse statistique (analyse de variance) des différents paramètres montre que :

- concernant la composition en lipides (notamment C18 :1 ; C18 :2 et C18 :3 dont la somme constitue plus de 80 % des acides gras totaux), les teneurs étant remarquablement constantes entre le soja MON 89788 et le soja témoin A3244, il est possible de considérer que l'huile extraite de soja MON 89788 est équivalente à celle du soja témoin A3244 ;
- concernant les acides aminés essentiels, les teneurs ne diffèrent pas significativement entre le soja MON 89788 et le soja témoin A3244 et sont comparables aux teneurs mesurées en 1992 dans le soja 40-3-2³ également tolérant au glyphosate ;
- concernant la daidzéine, la génistéine et la glycitéine, les teneurs moyennes tous sites confondus ne sont pas affectées par la modification génétique ;
- concernant les facteurs antinutritionnels (inhibiteur de trypsine) et les α -galactosides (stachyose et raffinose), les teneurs ne sont pas non plus affectées par la modification génétique ;

Considérant l'absence d'effet significatif sur la composition, l'ensemble des données présentées permet de conclure à l'équivalence en substance des graines (et de l'huile) entre le soja MON 89788 et le soja témoin A3244 ;

(7.5) **Spécificité des produits, effets des traitements**

Considérant que, bien que l'on ne dispose pas de données relatives à l'effet des traitements technologiques de la graine consécutive à la trituration, notamment l'effet de la chaleur sur les facteurs antinutritionnels et toxiques, il a été montré une très forte destruction des facteurs antitrypsiques lors du toastage, avec conservation des lectines, des α galactosides et des isoflavones³ ;

(7.8) **Toxicologie**

Considérant que plusieurs éléments permettent de considérer que la protéine CP4 EPSPS n'aura pas d'effet toxique ou délétère :

- la protéine CP4 EPSPS exprimée dans le soja MON 89788 est similaire à celles exprimée dans les variétés de soja 40-3-2 et de maïs NK 603 autorisées à la consommation humaine et animale ;
- la similarité de CP4 EPSPS avec les EPSPS du soja, du maïs et de nombreuses protéines EPSPS d'origine microbienne (identité de séquence de 23 à 50% ; similarité de séquence de 48 à 54%) ;
- la comparaison de la séquence de la protéine CP4 EPSPS exprimée dans le soja MON 89788 ne met pas en évidence de similarité de structure avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques ;

³ Padgett SR, Taylor NB, Nida DL, Bailey MR, MacDonald J, Holden LR and Fuchs RL. (1996). The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans J. Nutr.126 :702-716.

Considérant que l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine CP4 EPSPS synthétisée par *E. coli* et extraites de MON 89788 a été démontrée (même poids moléculaire : 44-47,6 kDa, activité spécifique voisine : 3,7 UI/mg de protéine (plante) et 4,4 UI/mg de protéine (microbienne), séquence terminale identique) ;

Considérant que :

- une étude de toxicité aiguë par voie orale chez la souris réalisée avec la protéine CP4 EPSPS extraite d'*E. coli* montre qu'à la dose de 572 mg/kg, on n'observe aucun effet délétère sur les animaux testés ;
- la marge de sécurité calculée à partir de cette dose unique et en tenant compte de la teneur maximale en protéine CP4 EPSPS dans le soja, est de l'ordre de 60 000 au regard de l'exposition alimentaire estimée des adultes et des adolescents. Il convient cependant de s'interroger sur la pertinence d'un tel calcul fondé sur une donnée de toxicologie aiguë ;

Considérant qu'*in vitro* la protéine CP4 EPSPS extraite d'*E. coli* est rapidement dégradée en milieu gastrique simulé, soit 95 à 98 % dans les 15 secondes et totale en 2 minutes ;

Considérant qu'une étude de toxicité subchronique (90 jours) a été réalisée chez des rats des deux sexes (20 animaux de chaque sexe par traitement) en vue d'étudier l'effet de la consommation de tourteau de soja MON 89788, incorporé à hauteur de 5 % ou 15 % dans la ration alimentaire en comparaison avec la consommation de tourteau de soja témoin A3244 (incorporé à hauteur de 15 % dans la ration) ;

Considérant que seuls les résultats résumés étant disponibles dans le dossier, bien que ces résultats ne rapportent aucun effet délétère sur les performances, les données de pathologie clinique et les observations nécropsiques, il n'est pas possible de conclure en l'absence des données expérimentales de l'étude ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant qu'au regard des éléments suivants, l'existence d'un potentiel allergénique de la protéine CP4 EPSPS ne peut pas être suspectée :

- l'absence d'homologie de séquence de la protéine CP4 EPSPS avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ;
- l'absence de glycosylation de cette protéine dans le soja ;
- la capacité de CP4 EPSPS à être dégradée ou digérée *in vitro* en milieu gastrique ou intestinal simulé ;
- la très faible teneur de CP4 EPSPS par rapport à la teneur en protéines totales des graines de soja ;
- une instabilité de la protéine à la chaleur (toastage) observée par la réactivité fonctionnelle (ELISA) ;

Considérant qu'il convient cependant de noter que ces données, notamment les résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et la comparaison de séquences, 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 qu'en complément à ces résultats physico-chimiques, un test effectué sur les sérums de 16 patients reconnus allergiques au soja et de 6 patients non allergiques n'a pas montré plus d'allergie prévisible avec le soja MON 89788 qu'avec le soja témoin A3244 ;

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée chez des poulets (400 mâles et 400 femelles, 10 répétitions par traitement) nourris pendant 42 jours avec deux régimes [correspondant aux périodes de démarrage (0-21 jours), de croissance et de finition (21-42 jours)] à base de soja MON 89788 (33 et 30 %) en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec du soja témoin A3244 et 6 variétés commerciales de soja cultivés aux Etats-Unis ;

Considérant qu'une analyse de composition chimique entre le soja MON 89788 et le soja témoin (constituants nutritionnels fourragers (7), acides aminés (18), minéraux (13 dont le soufre) a été réalisée et que les résultats confirment l'analyse de composition précédemment présentée, permettant de conclure à l'équivalence de composition nutritionnelle entre les différentes rations utilisées dans l'étude ;

Considérant que les observations ont porté sur 8 paramètres zootechniques, 13 données de carcasse, 6 paramètres sur la composition de 2 muscles des animaux découpés et que le taux de mortalité enregistré (1 à 5 % selon les traitements) au cours de l'expérimentation est non lié à la modification génétique ;

Considérant que les résultats, après analyse statistique, montrent qu'on observe :

- un effet sexe significatif sur quelques paramètres de performance (performances pondérales, données de découpe et de composition des muscles), ce qui signifie une bonne conduite de l'expérimentation ;
- aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le soja MON 89788 et le soja témoin A3244 ou les variétés commerciales testées pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence nutritionnelle du tourteau de soja MON 89788 avec son témoin non génétiquement modifié,

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

- la construction génétique du soja MON 89788 est bien caractérisée,
- l'analyse de composition ne met pas en évidence de différence significative compromettant l'équivalence en substance du soja MON 89788 par rapport au soja isogénique A3244 et aux variétés de sojas conventionnels,
- l'étude d'alimentarité réalisée chez le poulet ne met pas en évidence de différence nutritionnelle entre le tourteau de soja MON 89788 et les tourteaux de sojas témoin ou conventionnels,

estime cependant que, bien que les résultats résumés de l'étude de toxicité subchronique de 90 jours chez le rat ne montrent pas d'effets délétères, en l'absence des données expérimentales de cette étude, elle ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire des produits dérivés du soja MON 89788.

Pascale BRIAND