

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 10 juin 2021

## **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 DBN9004, développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et au glyphosate pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-BE-2019-165)**

---

*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 17 mars 2021 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 DBN9004, développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et au glyphosate pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-BE-2019-165).

#### **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 réalisée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 15 avril et le 20 mai 2021 sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides de l'EFSA (2019a) et du Panel GMO de l'EFSA (2006 et 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 : <https://dpi.sante.gouv.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 2019, les dix premiers pays producteurs de soja étaient le Brésil, les USA, l'Argentine, la Chine, l'Inde, le Paraguay, le Canada, la Russie, l'Ukraine et la Bolivie qui représentaient environ 96 % de la production mondiale. La production mondiale était de 333,67 millions de tonnes sur une surface cultivée de 120,5 millions d'hectares (FAOStat<sup>1</sup>) dont 74 % étaient génétiquement modifiées (ISAAA<sup>2</sup>, 2019).

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, 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 DBN9004 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 *C-pat* et *C-cp4 epsps* codant respectivement une phosphinotricine N-acétyltransférase (protéine PAT) et une 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase d'*Agrobacterium sp.* souche CP4 (protéine CP4 EPSPS). La protéine PAT confère à la plante la tolérance au glufosinate-ammonium en l'acétylant en N-acétyl L-glufosinate (NAG), métabolite non phytotoxique. En comparaison de l'EPSPS endogène du soja, la protéine CP4 EPSPS présente une affinité réduite pour le glyphosate, conférant à la plante son caractère de tolérance à cet herbicide.

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

<sup>2</sup> International service for the acquisition of agri-biotech applications

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 DBN9004. 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.

## **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 Jack.

#### **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 hypocotyles de soja.

Des hypocotyles de soja ont été prélevés et co-cultivés avec la souche EHA101 d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, portant le vecteur binaire pDBN4003 ainsi que le plasmide auxiliaire pSB1. pSB1 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 milieux sélectifs contenant de la céphalosporine (élimination des *A. tumefaciens* résiduelles) et du glyphosate (sélection des cellules transformées). En présence de glyphosate, 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 pDBN4003 utilisé pour la transformation porte les deux cassettes d'expression des gènes *C-pat* et *C-cp4 epsps* entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T.

La cassette d'expression du gène *C-pat* contient une séquence modifiée codant une phosphinotricine N-acétyltransférase de la bactérie *Streptomyces viridochromogenes*. La protéine exprimée PAT confère la tolérance au glufosinate-ammonium. Le gène *C-pat*, dont la séquence codante a été optimisée pour l'expression en cellule végétale, est placé sous le contrôle de séquences promotrice et terminatrice du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CMV, Cauliflower Mosaic Virus).

La cassette d'expression du gène *C-cp4 epsps* contient une séquence codante de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase d'*Agrobacterium sp.* souche CP4. La protéine exprimée CP4 EPSPS confère la tolérance au glyphosate. Le gène *C-cp4 epsps* dont la séquence codante a été modifiée est placé sous le contrôle :

- de la séquence promotrice du polypeptide EF-1 du soja,
- de la séquence du gène *shkG* correspondant au peptide de localisation de la protéine EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* permettant l'adressage de la protéine CP4 EPSPS dans le chloroplaste,
- et de la région 3' non codante du gène E9 de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase de pois.

### II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Le locus d'insertion et les séquences insérées présentes dans le génome du soja DBN9004 (générations T3, T5 et T7) ont été caractérisés par Southern blot. L'analyse des résultats obtenus montre une insertion unique de l'ADN-T et l'absence de séquences plasmidiques dans le génome du soja DBN9004.

Les séquences des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (respectivement 1268 pb et 992 pb) pour le soja DBN9004 ont été comparées avec le génome du soja Williams 82 présent dans la base de données « SoyBase de l'USDA-ARS Soybean Genetics and Genomics Database ». Ces comparaisons de séquences permettent de localiser l'insertion unique de l'ADN-T dans le chromosome 13 et mettent en évidence une délétion de 1545 pb du génome au site d'insertion de l'ADN-T dans le soja DBN9004. Toutefois, la comparaison de la séquence du soja DBN9004 avec celle de la variété isogénique Jack est nécessaire pour pouvoir conclure que cette délétion de 1545 pb est consécutive à l'intégration de l'ADN-T et non pas constitutive de la variété Jack.

Ces analyses bioinformatiques identifient deux gènes potentiels à proximité du site d'insertion de l'ADN-T en 5' et en 3'. Le GT « Biotechnologie » propose que le pétitionnaire détermine par RT-PCR dans les variétés Jack et DBN9004 si ces gènes sont exprimés dans le soja et dans ce cas, si leurs niveaux d'expression ne sont pas modifiés par la transformation génétique. Une recherche bioinformatique pourrait aussi être réalisée sur des bases de données d'expression, EST et RNA seq, pour savoir dans quels organes et dans quelles conditions ces deux gènes potentiels s'expriment ou non dans le soja.

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des jonctions ne mettent en évidence aucune identité totale, globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergéniques connues (2020). De même, pour les analyses bioinformatiques des ORF potentiels au niveau de l'insert avec les protéines allergéniques connues (2020). Sur les 273 ORF analysés au niveau de l'insert, un ORF de 647 nucléotides est localisé au niveau de la séquence du gène PAT. Il possède une homologie de séquence avec la séquence correspondant au domaine N-acétyltransférase d'une protéine de la famille des GNAT (GCN 5-related N-acetyltransferases). Cette homologie est cohérente puisque la protéine PAT est une N-acétyltransférase. Ce point est discuté au chapitre II.1.4.1 (analyse des protéines nouvellement exprimées).

Les teneurs en protéines PAT et CP4 EPSPS dans divers tissus (feuilles, racines, fourrage, et graines) prélevés à différents stades de développement de la plante (génération T7) ont été mesurées à l'aide de tests ELISA (EFSA, 2018). Les plantes de soja DBN9004 ont été cultivées sur 5 sites en Chine en 2020 avec ou sans traitement avec les herbicides d'intérêt (glufosinate-ammonium et glyphosate). Les concentrations des protéines PAT et CP4 EPSPS sont quantifiables dans tous les tissus analysés de soja DBN9004 traité ou non avec le glufosinate-ammonium et le glyphosate. Les concentrations moyennes les plus élevées pour les deux protéines d'intérêt sont mesurées dans les feuilles (100,13 µg/g de matière sèche pour la protéine PAT et 699,29 µg/g de matière sèche pour la protéine CP4 EPSPS).

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 DBN9004 non traité avec le glufosinate-ammonium et le glyphosate, la concentration moyenne de protéine PAT est de 1,14 (± 0,27) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine CP4 EPSPS est de 192,39 (± 40,95) µg/g de matière sèche. Dans les graines de soja DBN9004 traité avec le glufosinate-ammonium et le glyphosate, la concentration moyenne de protéine PAT est de 1,17 (± 0,34) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine CP4 EPSPS est de 191,85 (± 40,53) µg/g de matière sèche. Dans le fourrage de soja DBN9004 non traité avec le glufosinate-ammonium et le glyphosate, la concentration moyenne de protéine PAT est de 19,50 (± 7,46) µg/g de matière sèche et la concentration moyenne de

protéine CP4 EPSPS est de 492,02 ( $\pm$  80,91)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche. Dans le fourrage de soja DBN9004 traité avec le glufosinate-ammonium et le glyphosate, la concentration moyenne de protéine PAT est de 18,60 ( $\pm$  5,39)  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche et la concentration moyenne de protéine CP4 EPSPS est de 489,86 ( $\pm$  77,14)  $\mu\text{g/g}$  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 en temps réel, sur 2 générations (F2 et F3) permet de conclure que l'insertion est unique et à hérédité mendélienne. La stabilité génétique du locus GM du soja DBN9004 a été confirmée au sein des générations T3, T5 et T7 par Southern blot et sa stabilité phénotypique sur la tolérance au glufosinate-ammonium et au glyphosate des plantes, au sein des générations T2, T3, T4, T5, T6 et BC3F3.

#### II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier permettent d'analyser la caractérisation moléculaire du soja DBN9004. En l'absence des données d'expression des deux gènes identifiés par l'analyse bioinformatique à proximité de l'ADN-T, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité de la construction moléculaire.

### II.1.3. Evaluation comparative

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

Le soja DBN9004 est comparé à son équivalent non transgénique Jack. Au total, six variétés commerciales conventionnelles non transgéniques ont été utilisées comme témoins dans les essais réalisés en 2020.

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

Le soja DBN9004, la variété témoin isogénique Jack et les variétés commerciales (3 variétés par site) ont été cultivés sur 8 sites en 2020. Deux autres variétés de soja génétiquement modifiées ont été mises en œuvre dans ces essais. Ne faisant pas l'objet de la demande d'autorisation de mise sur le marché, les données concernant ces deux autres variétés de soja GM n'ont pas été expertisées par le GT « Biotechnologie ».

Les 8 sites expérimentaux sont indiqués par le pétitionnaire comme représentatifs de la production de soja en Chine. 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 DBN9004, deux modalités sont réalisées : soit les plantes ne subissent pas de traitement avec un herbicide comme pour les variétés témoins, soit elles reçoivent un traitement avec du glufosinate-ammonium et du glyphosate. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011).

Des échantillons ont été récoltés et des analyses réalisées sur les 8 sites d'essais. Les conditions d'échantillonnage (modalités, nombre de répétitions...) et l'identification des données (identification de l'échantillon utilisé...) fournies sont insuffisamment précises et décrites. Le GT « Biotechnologie » relève également des incohérences entre les modes d'expression des résultats (g/kg et %) dans les tableaux et dans le texte du dossier.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition ont fait l'objet d'une analyse statistique. En l'absence de description du modèle statistique utilisé et de la fourniture des codes de programmes, il n'est pas possible d'expertiser l'analyse statistique réalisée.

#### 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.

#### II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Cinquante-sept paramètres ont été mesurés pour la graine et six pour le fourrage. En l'absence des informations sur l'analyse statistique réalisée et compte tenu des imprécisions présentes dans le dossier, le GT « Biotechnologie » ne se prononce pas sur l'analyse de composition du soja DBN9004.

#### II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 13 paramètres.

En l'absence des informations sur l'analyse statistique réalisée, le GT « Biotechnologie » ne se prononce pas sur l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques du soja DBN9004.

#### II.1.3.6. Effets de la transformation

Le pétitionnaire affirme que les produits issus du soja DBN9004 ne devraient pas être différents de ceux issus de sojas conventionnels et ne présente aucune analyse des produits transformés.

#### II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

En raison d'imprécisions et d'informations manquantes telles que la description du modèle statistique et des codes des programmes utilisés, le GT « Biotechnologie » ne peut pas conclure en ce qui concerne l'évaluation comparative du soja DBN9004.

### **II.1.4. Toxicologie**

#### II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Deux protéines exogènes PAT et CP4 EPSPS sont exprimées dans le soja DBN9004.

La protéine CP4 EPSPS ne présente pas d'identité de séquences globale ou locale avec des protéines toxiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2020). La protéine PAT présente une homologie de séquences globale ou locale avec une séquence correspondant au domaine N-acétyltransférase des protéines de la famille des GNAT (GCN 5-related N-acetyltransferases). Le pétitionnaire présente très brièvement quelques éléments d'information sur cette famille de protéines. Le GT « Biotechnologie » considère que les éléments apportés sont insuffisants et devraient être complétés par une documentation approfondie de la sécurité de la famille des GNAT.

Le pétitionnaire souligne aussi un historique de consommation sûre des protéines PAT et CP4 EPSPS sans étayer cette affirmation. Le GT « Biotechnologie » souhaiterait la présentation d'une synthèse des principaux résultats obtenus à partir des études de toxicité déjà conduites avec les protéines PAT et CP4 EPSPS isolément ou conjointement.

Les protéines PAT et CP4 EPSPS sont rapidement dégradées en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro*. Ce sont des protéines thermostables capables de résister à des températures de 95 °C sans dégradation et dénaturation complète. Par contre, ces deux protéines sont inactivées à des températures plus basses (55 °C pour PAT, 65 °C-75 °C pour CP4 EPSPS). Les teneurs en protéines PAT et CP4 EPSPS sont faibles dans les graines et le fourrage issus du soja DBN9004 traité ou non avec les herbicides d'intérêt (cf chapitre II.1.2.2).

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines PAT et CP4 EPSPS. 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 en dehors des protéines PAT et CP4 EPSPS.

#### 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 DBN9004.

#### 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 2018-2019 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Sept groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Sprague-Dawley (Beijing Vital River Laboratory Animal Co) ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 20 % (p/p) de farine de graines non déshuilée issue de soja de la variété génétiquement modifiée DBN9004,
- 10 % (p/p) de farine de graines non déshuilée issue de soja de la variété génétiquement modifiée DBN9004 et 10 % issue de la variété témoin Jack,
- 20 % (p/p) de farine de graines non déshuilée issue de soja de la variété témoin Jack,
- 20 % (p/p) de farine de graines non déshuilée issue de soja de 4 variétés commerciales non génétiquement modifiées (1 variété par groupe).

Le pétitionnaire n'indique pas si le soja DBN9004 utilisé dans cette étude a été traité ou non avec les herbicides d'intérêt ce qui est une exigence du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013. Les certificats d'analyse des aliments distribués aux rats ne sont pas disponibles en anglais dans le dossier ce qui ne permet pas de s'assurer de la recevabilité de l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours.

Les données brutes sont disponibles sous format électronique. Le programme de calcul est fourni mais l'analyse statistique conduite devrait être décrite plus précisément. En particulier le pétitionnaire devrait détailler les tests statistiques effectués, en précisant si une correction des p-valeurs a été effectuée pour prendre en compte la multiplicité des tests. En effet, cette correction influe grandement sur la puissance des tests.

Les données individuelles de l'étude sont présentées mais le pétitionnaire devrait aussi présenter les données historiques du centre investigateur.

Le pétitionnaire n'a pas réalisé de calcul de puissance alors qu'il est nécessaire pour des groupes de 16 rats/sexe/traitement.

#### II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines PAT et CP4 EPSPS ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale. Néanmoins, le pétitionnaire devra fournir des éléments complémentaires sur la sécurité de la protéine PAT.

Des informations complémentaires sont indispensables pour pouvoir réaliser une expertise de l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur. Une présentation et une justification biologique des tailles d'effet choisies par le pétitionnaire pour les différents paramètres est nécessaire afin de pouvoir valider un calcul de puissance. De plus, le pétitionnaire devrait fournir les données historiques du centre investigateur.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du soja DBN9004 sur la base des éléments disponibles 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 PAT et CP4 EPSPS exprimées dans le soja DBN9004 a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2017), 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.

Les sources des protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée sont *Streptomyces viridochromogenes* pour PAT et *Agrobacterium sp.* souche CP4 pour CP4 EPSPS. La bibliographie présentée n'évoque pas de risque particulier pour ces sources.

Les protéines PAT et CP4 EPSPS ne présentent pas d'identité de séquences totale, globale ou locale avec des protéines allergéniques connues et répertoriées dans des bases de données actualisées ou avec les peptides immunotoxiques de la maladie cœliaque (2020). Les protéines PAT et CP4 EPSPS sont rapidement dégradées en conditions de protéolyse digestive simulées *in vitro*. Ce sont des protéines thermostables capables de résister à des températures de 95 °C sans dégradation et dénaturation complète. Par contre, ces deux protéines sont inactivées à des températures plus basses (55 °C pour PAT, 65 °C-75 °C pour CP4 EPSPS). Les teneurs en protéines PAT et CP4 EPSPS sont faibles dans les graines et le fourrage issu du soja DBN9004 traité ou non avec les herbicides d'intérêt (cf chapitre II.1.2.2).



Les deux protéines PAT et CP4 EPSPS exprimées dans le soja DBN9004 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 (règlement (UE) n°1169/2011). 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 déceler 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 DBN9004 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 7 (protéine biotinylée spécifique de la graine, SSBP), Gly m 8 (albumine 2S), du précurseur de la glycinine, 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. En absence des informations sur l'analyse statistique réalisée pour l'analyse comparative de la composition (chapitre II.1.3.4), le GT « Biotechnologie » ne peut pas statuer sur l'équivalence de composition pour les allergènes endogènes entre le soja DBN9004 et des variétés de soja conventionnelles.

Le GT « Biotechnologie » ne peut donc pas se prononcer sur l'allergénicité potentielle du soja DBN9004.

#### 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 PAT et CP4 EPSPS exprimées dans le soja DBN9004 peut être considéré comme faible. Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les graines et le fourrage du soja DBN9004 et n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur l'allergénicité potentielle du soja DBN9004 en l'absence d'une validation de l'équivalence de composition pour les allergènes endogènes entre le soja DBN9004 et des variétés de soja conventionnelles.

#### II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le soja DBN9004 et des variétés de soja conventionnelles.

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

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au soja DBN9004 pour l'animal et l'Homme.

Les concentrations moyennes en protéines nouvellement exprimées proviennent des données de l'étude au champ conduite en 2020 pour caractériser le soja DBN9004 (chapitre II.1.2.2).

Elles sont générées à partir des analyses des graines matures de soja DBN9004 traité au glufosinate-ammonium et au glyphosate et exprimées en  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche. Elles sont de 171,81  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche pour CP4 EPSPS et de 1,05  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche pour PAT.

L'estimation de la consommation journalière des protéines CP4 EPSPS et PAT **par l'animal** est fondée sur des données du NRC<sup>3</sup> relatives à la consommation de soja par les animaux d'élevage (NRC, 1994, 1998, 2011), les teneurs moyennes en protéines des graines de soja DBN9004 et un scénario du pire cas (tout le soja consommé est considéré étant du soja DBN9004). L'autorisation de culture en Europe n'étant pas demandée pour le soja DBN9004, le pétitionnaire considère que le fourrage de soja ne sera pas consommé en Europe et en conséquence, il limite ses estimations à la consommation de tourteau de soja par les animaux. Les protéines de la graine se retrouvant dans les tourteaux après séparation de l'huile, le pétitionnaire utilise un facteur correctif basé sur le rendement d'extraction qu'il applique aux teneurs en protéines exogènes ; un kg de graines conduit à 740 g de tourteau contenant la totalité des protéines. Les teneurs moyennes calculées en protéines CP4 EPSPS et PAT sont alors de 232,2  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche pour CP4 EPSPS et de 1,42  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche pour PAT.

En utilisant les données du NRC et ce scénario du « pire des cas », le pétitionnaire estime que les apports journaliers les plus élevés sont obtenus chez les poulets en considérant un apport protéique de 18 g de protéines/kg de poids corporel/jour. Ce scénario correspondrait à une ingestion de 6269  $\mu\text{g/kg}$  de poids corporel (p.c.)/jour de protéine CP4 EPSPS et de 38  $\mu\text{g/kg}$  p.c./jour de protéine PAT.

Le GT « Biotechnologie » considère que le pétitionnaire devrait utiliser les données de consommation les plus récentes présentes dans le document de l'OCDE (2013). En utilisant ces données de consommation pour l'Europe (OCDE, 2013) et les hypothèses formulées par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » a calculé les apports journaliers. Les plus élevés sont obtenus chez les dindes et les poulets de chair pour la consommation de tourteau de soja. Ces données permettent de calculer une ingestion de 8333  $\mu\text{g/kg}$  p.c./jour de protéine CP4 EPSPS et de 50,8  $\mu\text{g/kg}$  p.c./jour de protéine PAT pour les dindes et de 7320  $\mu\text{g/kg}$  p.c./jour de protéine CP4 EPSPS et de 44,6  $\mu\text{g/kg}$  p.c./jour de protéine PAT pour les poulets de chair. Ces calculs conduisent donc à une estimation de consommation des protéines CP4 EPSPS et PAT supérieures à celles présentes dans le dossier, les plus élevées se retrouvant aussi chez les volailles.

L'estimation de l'exposition alimentaire aiguë et chronique **de l'Homme** aux protéines CP4 EPSPS et PAT via la consommation de denrées provenant de graines de soja DBN9004 est réalisée selon les recommandations de l'EFSA (2019b).

Les données de consommation aiguë et chronique des denrées utilisées par le pétitionnaire sont celles du fichier Excel sur le soja mis à disposition sur le site de l'EFSA<sup>4</sup>. Les denrées contenant du soja et les facteurs de conversion proviennent des statistiques de consommation de soja. Les facteurs de conversion sont appliqués pour calculer l'apport de chaque denrée en « équivalent matière première » (graines de soja).

<sup>3</sup> National Research Council

<sup>4</sup> <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/applications/Soybean.xlsx>

Des hypothèses conservatives sont formulées par le pétitionnaire :

- tout le soja consommé est du soja DBN9004,
- les procédés de transformation des aliments n'impactent pas les concentrations en protéines exogènes qui restent identiques à celles présentes dans les graines de soja DBN9004.

Les expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines CP4 EPSPS et PAT via la consommation de graines de soja DBN9004 sont alors calculées par le pétitionnaire selon les mêmes équations et pour toutes les catégories de population et chaque étude alimentaire présente dans la base EFSA. En sélectionnant les données de consommation aiguë ou chronique et les concentrations en protéines CP4 EPSPS et PAT, les moyennes des expositions alimentaires aiguë et chronique correspondent pour chaque denrée, à la somme des consommations moyennes multipliées par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion.

Pour les forts consommateurs, les expositions alimentaires aiguë et chronique correspondent à la consommation au percentile 95 de la denrée la plus contributrice multipliée par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion, à laquelle s'ajoute pour toutes les autres denrées, la somme des consommations moyennes multipliées par la concentration moyenne de la substance multipliée par le facteur de conversion. Les différentes denrées étant obtenues à partir d'un mélange de graines, la concentration de la substance utilisée dans ce calcul est la concentration moyenne mesurée dans les graines (matière première) et non un percentile élevé de la concentration.

Sont repris dans le tableau 1, les expositions alimentaires calculées (moyenne et forts consommateurs) en protéines CP4 EPSPS et PAT les plus élevées ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel/jour) en indiquant aussi le pays et la catégorie de population.

**Tableau 1** : Expositions alimentaires aiguë et chronique de l'Homme aux protéines CP4 EPSPS et PAT via la consommation de graines de soja DBN9004. Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel/jour.

		Pays	Catégorie de population	Denrée la plus contributrice	CP4 EPSPS	PAT
<b>Exposition aiguë</b>	<b>moyenne</b>	Belgique	Enfants en bas âge (Toddlers)		25,82	0,16
	<b>Forts consommateurs</b>	Suède	Adultes	Compléments alimentaires protéinés destinés aux sportifs	2794,66	17,08
<b>Exposition chronique</b>	<b>moyenne</b>	Belgique	Enfants en bas âge (Toddlers)		25,82	0,16
	<b>Forts consommateurs</b>	Estonie	Adolescents	Farine de graines de soja	214,26	1,31

### II.3 Caractérisation des risques

Ce chapitre n'a pas été documentée par le pétitionnaire.

#### **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.

#### **II.7 Informations complémentaires sur la sécurité des denrées et des aliments pour animaux génétiquement modifiés**

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2010-2020, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (2019a) pour procéder à cette revue systématique de la littérature.

La formulation de la question, la recherche par mots clés, les combinaisons des termes et les opérateurs booléens sont appropriés.

Les deux bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du soja DBN9004. Les critères d'inclusion pour la sélection des articles sont appropriés.

Le pétitionnaire a fait appel à 3 « reviewers » pour conduire cette analyse de façon indépendante. Des informations sont apportées sur leurs niveaux de compétences et d'indépendance. Il n'y a pas de présentation de test de cohérence entre les 3 « reviewers ».

Cette revue de la littérature a permis d'identifier 6216 références distinctes. Après sélection sur les critères d'inclusion, 28 références ont été soumises à lecture et évaluation. Après analyse, les « reviewers » ont exclu 15 publications (titres et raisons d'exclusion fournies) et ont jugé pertinentes 13 publications. Ces dernières sont mises à disposition dans le dossier. Sept publications portent sur des maïs génétiquement modifiés et 6 sur un autre soja génétiquement modifié. Les auteurs des 13 publications ne paraissent pas affiliés au pétitionnaire.

Le pétitionnaire conclut que ces articles ne mettent pas en évidence de risque sanitaire pour la consommation humaine ou animale du soja DBN9004.

#### **Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »**

En l'absence des données d'expression des deux protéines potentiellement codées par des gènes identifiés par l'analyse bioinformatique à proximité de l'ADN-T, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité de la construction moléculaire.

Le potentiel allergénique des protéines PAT et CP4EPSPS paraît faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA. Le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur l'allergénicité potentielle du soja DBN9004 en l'absence d'une validation de l'équivalence de composition pour les allergènes endogènes entre le soja DBN9004 et des variétés de soja conventionnelles.

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, le GT « Biotechnologie » ne peut pas conclure sur l'évaluation comparative du soja DBN9004, ni sur sa sécurité.

Dans ces conditions, le « GT Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du soja DBN9004.

#### 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 », qui constate ne pas pouvoir se prononcer sur la sécurité du soja DBN9004 compte tenu de l'absence dans le dossier de certaines données au regard des 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-CLÉS

OGM, soja DBN9004, tolérance au glufosinate-ammonium, tolérance au glyphosate, PAT, CP4 EPSPS

*GMO, DBN9004 soybean, glufosinate-ammonium tolerance, glyphosate tolerance, PAT, CP4 EPSPS*

#### BIBLIOGRAPHIE

EFSA. 2017. "Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants". EFSA Journal 15: 1–49.

EFSA, 2018. "Explanatory note on the determination of newly expressed protein levels in the context of genetically modified plant applications for EU market authorisation". EFSA supporting publication 2018:EN-1466. 13 p

EFSA. 2019a. "Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market - Note on literature searching to GMO risk assessment guidance" EFSA journal, 2019:EN-1614, 1-62.

EFSA. 2019b. Statement on the human dietary exposure assessment to newly expressed proteins in GM foods. EFSA Journal 17 (7):5802, 18 pp.

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

ISAAA. 2019. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019 : Biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier." ISAAA brief N° 55. ISAAA:Ithaca, NY.

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

NRC (National Research Council). 1994. Nutritional requirements of poultry: Ninth revised edition, 1994. The national academies of sciences, engineering, medicine, The national academic press, Washington DC, US, 174 pp.

NRC (National Research Council). 1998. Nutritional requirements of swine: Tenth revised edition, 1998. The national academies: Advisors to the nation on science, engineering, and medicine, National academy press, Washington DC, US, 211 pp.

NRC (National Research Council). 2001. Nutritional requirements of dairy cattle: Seventh revised edition, 2001. National academy press, Washington DC, US, 401 pp.

OCDE. 1998. "OECD Guideline for the testing of chemicals N°408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents." Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

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

OCDE. 2015. Safety Assessment of Foods and Feeds Derived from Transgenic Crops, Volume 2, Novel Food and Feed Safety, Editions OCDE, Paris.

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 (UE) n° 1169/2011 du Parlement Européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n° 1924/2006 et (CE) n° 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n° 608/2004 de la Commission. JO L 304 du 22.11.2011, pp. 1-60.

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.

## CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2021). Avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du soja génétiquement modifié DBN9004 développé pour être tolérant au glufosinate-ammonium et au glyphosate pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-BE-2019-165) (saisine 2021-SA-0050). Maisons-Alfort : Anses, 14 p.