



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 11 mai 2010

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du soja
génétiquement modifié MON 87769, développé pour présenter une teneur
modifiée en acides gras (oméga-3), pour l'importation et la transformation
ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM, au titre
du règlement (CE) n° 1829/2003**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le lundi 22 février 2010 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié MON 87769, développé pour présenter une teneur modifiée en acides gras (oméga-3), pour l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2009-76).

CONTEXTE

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

METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective été réalisée par le Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 15 avril 2010 et le Comité d'expert spécialisé "Nutrition humaine", réuni le 6 mai 2010.

ARGUMENTAIRE

L'argumentaire suit les sections des lignes directrices de l'EFSA relatives aux demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003.

27-31, avenue
du Général Leclerc
94701

Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 50
Fax 01 49 77 26 13
www.afssa.fr

REPUBLIQUE
FRANÇAISE

(A) Information générale

Cette demande est une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine (huile, lécithine, isolat de protéines) et animale (tourteau ou graine entière). La demande ne concerne pas sa mise en culture dans l'Union Européenne.

Le soja est une source essentielle de protéines pour l'alimentation animale et d'huile pour l'alimentation humaine. L'huile de soja est la plus consommée après l'huile de palme. Elle contient une proportion élevée d'acides gras insaturés mais relativement peu d'acides gras oméga-3 sous la forme du précurseur de cette famille l'acide alpha-linolénique (C18 :3 n-3).

Le soja MON87769 exprime deux nouvelles protéines dans les graines, les réductases $\Delta 6$ (Pj $\Delta 6D$) et $\Delta 15$ (Nc $\Delta 15D$) impliquées dans les voies de biosynthèses des acides gras polyinsaturés, GLA (acide γ -linoléique, C18 :4 n-6) et surtout SDA (acide stéaridonique, C18 :4 n-3). La modification génétique conduit à une teneur forte en SDA dans la graine qui représente 20 à 30 % des lipides de la graine.

Le SDA est un intermédiaire métabolique entre l'acide alpha-linolénique et l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20 :5 n-3) et le DHA (acide docosahexaénoïque, C22 :6 n-3) contenus majoritairement dans les poissons et autres produits de la mer. Chez certaines espèces animales, en particulier chez l'homme, le SDA est partiellement transformé en EPA.

Selon le pétitionnaire :

- les sources classiques d'acides gras de type oméga-3 (huiles de poissons) sont insuffisantes pour répondre à la demande mondiale et le soja MON87769 pourrait être une source alternative ;
- le soja MON87769 est susceptible de participer à la réduction de cette pénurie croissante et ce d'autant plus que les consommateurs humains utilisent déjà l'huile de soja classique et que les animaux nourris avec du soja MON87769 auront un taux plus élevé d'acides gras de type d'oméga-3 dans leur viande et leur lait ;
- le SDA contient moins de doubles liaisons que l'EPA et DHA conduisant à une meilleure stabilité à la chaleur et à l'oxydation que ces derniers. Ces molécules y compris le SDA restent toutefois très oxydables.

(C) Informations relatives à la modification génétique

MON 87769 a été obtenu par la transformation de tissus méristématiques de soja par *Agrobacterium tumefaciens* portant un plasmide binaire de transformation.

Le plasmide contient deux ADN de transfert (ADN-T) distincts, l'un contenant les gènes codant pour la désaturase delta-6 (Pj $\Delta 6D$) de la primevère et pour la désaturase delta-15 (Nc $\Delta 15D$) du champignon *Neurospora crassa*. Le deuxième ADN de transfert contient la cassette d'expression du gène cp4 epsps qui confère la résistance au glyphosate et qui a permis la sélection des événements primaires de transformation. Les deux ADN-T sont encadrés par les bordures droites et gauches nécessaire à leur insertion dans le génome végétal.

Après sélection des transformants primaires, le second ADN-T (portant le gène marqueur) est éliminé par ségrégation dans la descendance. Le soja portant l'événement de transformation MON87769 ne contient que le premier ADN-T portant les gènes d'intérêt technologique.

Le plasmide de transformation contient en plus le gène de sélection bactérien *aadA* conférant la résistance à la spectinomycine et la streptomycine ainsi que les origines de répllication plasmidique dans *E. coli* et dans *A. tumefaciens*.

Les éléments du premier ADN-T (destinés à être insérés dans le génome de soja MON87769) sont présentés dans le tableau 1.

Eléments	Taille (pb)	Fonction
Bordure droite	356	ADN bordure droite d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> impliquée dans le transfert de l'ADN-T
P-7S α '	840	Promoteur et séquence "leader" du gène <i>Sphas1</i> du soja codant pour la protéine de stockage α '-bcsp qui permet la synthèse des ARNm dans la graine
CS-Pj Δ 6D	1340	Séquence codante pour la delta-6 désaturase de primevère
T-tml	949	Région 3' non-codante du gène tml d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
P-7S α	1679	Promoteur et séquence "leader" du gène <i>Sphas2</i> de soja codant pour la sous unité α de la protéine de stockage α '-bcsp qui permet la synthèse des ARNm dans la graine
CS-Nc.Fad3	1289	Séquence codante modifiée selon l'usage des codons pour une meilleure expression du gène de <i>Neurospora crassa</i> codant pour la Δ -15 desaturase
T-E9	642	Région 3' non-codante du gène rbcS2 de <i>Pisum sativum</i>
Bordure gauche	441	ADN bordure droite d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> impliquée dans le transfert de l'ADN-T

Tableau 1 : Eléments génétiques présents dans l'ADN-TI inséré dans les sojas MON87769.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(1) Les sojas portant l'événement de transformation MON87769 expriment deux nouvelles enzymes dans les graines :

- la désaturase Δ 6 (Pj Δ 6D) de la primevère, d'environ 51kDa (446 acides aminés)
- la désaturase Δ 15 (Nc Δ 15D) du champignon *Neurospora*, d'environ 49kDa (429 acides aminés).

Ces deux enzymes interviennent dans la voie de biosynthèse des acides gras de façon à poursuivre la transformation de l'acide linoléique (LA) en acide stéaridonique (SDA).

(2) Des hybridations de type Southern ont été réalisées sur trois profils de restrictions avec différentes sondes couvrant les différents éléments de l'ADN-TI.

Ces hybridations ont portées sur l'ADN génomique, extrait de feuilles provenant de plantes transgéniques homozygotes (MON87769) et de plantes quasi isogéniques non transgéniques (soja parentale A3525).

L'analyse des profils d'hybridation montre que chaque élément de l'ADN-TI (tableau 1) est retrouvé dans le soja transformé MON87769, et qu'une seule copie de la construction a été intégrée en une seule région du génome.

Des hybridations de type Southern ont été réalisées avec plusieurs sondes couvrant soit le plasmide soit l'ADN-T II et ont montré qu'aucun fragment d'ADN du squelette plasmidique et de l'ADN-TII n'est intégré dans le génome de MON87769.

La structure moléculaire des éléments insérés dans MON87769 a été vérifiée par leur séquençage après amplification PCR. Ainsi, la séquence nucléotidique de l'insert (7367 pb) a été entièrement déterminée, ainsi que 933 nucléotides et 831 nucléotides de la région génomique adjacente du soja en 5' en 3' de l'insertion.

La comparaison de ces séquences adjacentes de MON87769 avec la séquence native du soja conventionnel parentale A3525 montre que les régions sont contiguës. Elle met en évidence des microdélétions et microinsertions au niveau des jonctions 5' et 3' de l'insert avec l'ADN génomique. Une analyse bioinformatique montre que les séquences du génome de la plante au niveau du site d'insertion ne correspondent à aucune séquence codante déjà identifiée dans les bases de données.

Afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence codante n'a été créée par l'insertion, une étude bioinformatique de ces séquences frontières entre l'insertion et le génome de soja a été réalisée pour rechercher la présence de phases ouvertes de lectures (ORF) putatives entre deux codons stop et dans les 6 cadres de lecture. Dix ORF potentielles présentant un cadre de lecture d'au moins 8 acides aminés ont été identifiées. Aucune de ces ORF ne présente d'homologie significative avec des toxines ou des allergènes connus.

(3) Informations relatives à l'expression des produits du transgène

Les mesures d'accumulation des protéines PjΔ6D et NcΔ15D ont été déterminées sur 8 types de tissus (feuilles à 4 stades de développement, graines immatures, graines matures, plante entière et racines).

En raison de leur localisation membranaire, la méthode ELISA n'a pas pu être employée. Les niveaux des protéines PjΔ6D et NcΔ15D sont estimés par analyse densitométrique des films radiographiques après révélation par chimioluminescence et exposition des « immuno-blots ». La limite quantitative (LOQ) définie comme la plus basse quantité de protéine PjΔ6D ou de protéine NcΔ15D visuellement observée sur des films radiographiques a été déterminée pour chaque type de tissu végétal. De même que la quantification est réalisée par extrapolation de courbes standards obtenues avec des préparations de protéines purifiées. Toutefois ces courbes standards ne sont pas présentées dans les annexes ainsi que quelques exemples d'images radiographiques analysées.

Les échantillons de soja proviennent de deux campagnes d'essais menés aux USA l'une en 2006 sur 5 localisations (Iowa 2 sites, Illinois, Michigan, Ohio) et l'autre en 2007 sur 5 sites (Iowa, Michigan, Nebraska, Pennsylvanie et Wisconsin).

Les protéines s'accumulent dans les graines surtout immatures et dans la plante entière (tableau 2). Dans les feuilles et les racines, elles ne sont pas détectées.

	Protéine PjΔ6D µg/g de poids sec (déviat ion standard)		Protéine NcΔ15D µg/g de poids sec (déviat ion standard)	
	US saison 2006	US saison 2007	US saison 2006	US saison 2007
Plante entière	16 (9,5)	10 (11)	14 (6,8)	17 (14)
Graine immature	100 (63)	47 (27)	200 (89)	110 (41)
Graine mature	1,8 (0,95)	3,0 (3,3)	10 (6,5)	8,7 (3,8)

Tableau 2 : Teneurs moyennes en protéines PjΔ6D et NcΔ15D mesurées dans les sojas MON87769 au cours des essais réalisés aux Etats-Unis en 2006 et 2007.

(4) Caractéristiques agronomiques

Les caractéristiques agronomiques de la variété MON87769 ont été comparées à celle de la variété quasi-isogénique A3525. Les observations ont été effectuées sur des sojas cultivés sur 17 sites en 2006 et 4 en 2007 aux USA. Quatorze caractères phénotypiques et agronomiques ont été évalués. Diverses interactions avec l'environnement ont été comparées entre les deux variétés.

Aucune différence significative entre les sojas dans tous les essais n'a été mise en évidence. Les résultats obtenus permettent de conclure que la variété MON87769 a des propriétés agronomiques semblables à celles de son contrôle A3525.

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

L'hérédité de l'insert a été étudiée au cours de multiples générations de rétro-croisement. Les résultats montrent une ségrégation de type Mendélienne et les analyses par Southern ainsi que le séquençage des bordures confirment que l'insertion s'est faite dans le génome nucléaire.

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**(7.1-3) Analyse de composition chimique**

La composition chimique du soja MON87769 a été comparée à celle de la variété de référence quasi isogénique A3525 ainsi qu'à des variétés commerciales. L'analyse comparative de composition concerne la plante entière et la graine provenant de deux expérimentations en champ deux années consécutives (2006 et 2007). Les sojas (MON87769 et A3525 et variétés commerciales) sont cultivés conjointement sur 5 sites aux Etats-Unis. Les sites sont différents pour les 2 années, l'essai inclut 10 variétés commerciales en 2006 et 15 en 2007.

L'analyse suit les recommandations de l'OCDE et concerne 7 composés du fourrage, 75 de la graine dont 7 macro-éléments, les acides aminés, les acides gras, les facteurs antinutritionnels

(inhibiteur de trypsines, acide phytique, lectine, raffinose, stachyose), 3 isoflavones (daïdzéine, glycitéine et génistéine) et la vitamine E.

Elle comprend en plus des données sur des acides gras en rapport avec la modification génétique : le SDA, le GLA, le trans SDA et trans ALA (acide α -linoléique). Ces acides gras n'existent que dans les sojas MON87769.

L'analyse statistique appliquée est une analyse de variance afin d'identifier des différences (p value <0.05) pour chaque composé site par site et tous site confondus. Un intervalle de tolérance a été déterminé à partir des données provenant des variétés commerciales. Celui-ci comprend 99 % des données avec une confiance de 95 %. Les données sont aussi comparées à celles de la littérature et de la base de données de composition ILSI (International Life Sciences Institute-Crop Composition).

La composition chimique de la plante entière et de la graine de soja MON87769 présente quelques différences significatives avec celle du soja témoin. Toutefois, les valeurs restent dans l'intervalle de confiance calculé à partir des données des sojas commerciaux.

Aucune différence n'est observée sur les facteurs antinutritionnels. Parmi les isoflavones, deux ont des teneurs inférieures à celles mesurées dans le soja contrôle. Celles ci sont connues pour être très sensibles aux conditions de culture.

La quantité d'acides gras totaux n'est pas modifiée par la présence des deux gènes de réductase. Par contre, comme attendu, le SDA et le GLA représentent respectivement 26 et 7,1 % des acides gras de la graine de soja MON87769. Ces acides gras représentent donc, avec leurs dérivés trans, 35 à 40 % des acides gras totaux de la graine de soja MON87769. Le rapport oméga-6/oméga-3 est de l'ordre de 1,5 alors qu'il est de 6,9 dans le soja conventionnel. L'acide linoléique (LA) est la molécule précurseur des ALA, SDA et GLA, sa teneur est donc fortement diminuée (de 50 % environ) dans les graines de sojas MON87769. La concentration de quelques autres acides gras est légèrement modifiée (acide palmitique, oléique, linoléique, linoléique, arachidonique et béhénique).

(7.6) Effet du procédé de traitement

Les graines de soja sont soumises aux traitements suivants :

- 1) Elimination de la coque ;
- 2) Pressage à chaud qui permet de récupérer l'huile et la fraction solide délipidée (tourteau déshuilé toasté), riche en protéines et utilisée pour l'alimentation animale ;
- 3) Purification de l'huile (raffinée blanchie et désodorisée RBD) pour l'alimentation humaine ;
- 4) Purification des protéines à partir de la fraction délipidée pour l'alimentation humaine ;
- 5) Purification des lécithines à partir de la fraction délipidée pour l'alimentation humaine.

L'analyse comparée de la composition chimique des produits dérivés est présentée. Les produits de transformation analysés sont le tourteau, l'isolat de protéines, les lécithines et l'huile raffinée blanchie et désodorisée (RBD).

La composition de ces produits provenant de la transformation de la graine de soja MON87769 a été comparée à celle des produits issus de la graine de soja témoin A3545 et de 8 variétés de soja commerciales. 187 composants ont été mesurés dans les 4 fractions mais seulement 90 paramètres présentaient des valeurs suffisamment élevées pour être exploitables. Les concentrations de ces composants dans les 3 fractions délipidées de la graine de soja MON87769 (tourteau, isolat de protéines purifiées, lécithines) n'étaient pas différentes de celles des contrôles.

Description de l'huile et du procédé d'extraction

Le pétitionnaire indique que :

- le procédé d'extraction de l'huile ne sera pas différent de celui utilisé pour les graines de soja conventionnel qui préserve le SDA. Le procédé typique fait intervenir une extraction par un solvant, mais d'autres alternatives peuvent être utilisées comme la pression et l'extrusion ;
- en ce qui concerne le raffinage de l'huile, aucune étape d'hydrogénation n'aura lieu pour préserver la richesse en SDA de l'huile ;
- comme attendu, l'huile extraite de MON87769 contient trois acides gras non présents dans l'huile issue du soja conventionnel : le SDA est présent à hauteur de 22,6% en moyenne

(les niveaux varient entre 16,9 et 28,4 %), l'acide gamma-linolénique (C18 :3 n-6) à hauteur de 7,1 % et un isomère trans de l'acide stéaridonique (C 18 :4 6cis, 9cis, 12cis, 15trans) à hauteur de 0,18 %. Par ailleurs, l'huile raffinée issue de l'OGM diffère significativement de l'huile issue de la plante conventionnelle au niveau de la teneur en acides palmitique, stéarique et lignocérique et en l'isomère trans de l'acide alpha-linolénique. Ces différences sont toutefois faibles. La vitamine E est également contenue à des niveaux 20 % plus élevés dans l'huile issue du MON 87769, soit à une teneur de 8,61 mg/100g.

L'Afssa souligne que le procédé d'extraction de l'huile n'est pas clairement décrit et peut être différent selon l'industriel qui produira l'huile. Ainsi, des incertitudes quant à la qualité de l'huile et à sa stabilité demeurent.

L'Afssa estime que les différences de teneurs en acides palmitique, stéarique et lignocérique et en l'isomère trans de l'acide alpha-linolénique ne soulèvent pas de problèmes particulier. De même, la présence d'acide γ -linolénique n'est pas source d'inquiétude dans la mesure où cet acide gras et l'huile de bourrache le contenant principalement ont fait l'objet de nombreuses études. Cependant, la présence d'isomères trans de l'acide stéaridonique soulève plus de questions dans la mesure où cet acide gras n'a fait l'objet d'aucune étude.

Par ailleurs, l'Afssa s'interroge sur la stabilité de l'huile issue du MON 87769 étant donnée sa forte teneur en acide stéaridonique (de 17 à 28 % des acides gras totaux). L'Afssa souligne qu'aucune donnée sur l'oxydation ou sur les précautions d'emploi et de conservation de cette huile n'est fournie par le pétitionnaire.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Une estimation de la consommation de produits alimentaires contenant du soja dans les grandes zones de l'Europe en utilisant un outil développé par l'Organisation Mondiale de la Santé est présentée. L'huile de soja n'a pas été prise en considération dans cette estimation car elle ne contient pas ou très peu de protéines dont les réductases exprimées par le transgène. Par une approche très conservatrice, l'exposition en soja génétiquement modifié MON87769 dans la population générale et dans la fraction de la population (adultes et enfants de moins de 6 ans) consommant des quantités très élevées de produits à base de soja a été déterminée. L'exposition aux désaturases Pj Δ 6D et Nc Δ 15D en a été déduite.

Les marges de sécurité sont calculées à partir d'études de toxicité aiguë réalisées chez l'animal. Or, une dose sans effet néfaste exploitable pour calculer une marge de sécurité ne peut être déterminée qu'à partir d'une étude sub-chronique ou chronique réalisée chez l'animal. Le calcul des marges d'exposition aurait dû être réalisé à partir d'une telle étude et la consommation d'huile de soja aurait dû être prise en compte puisque l'objet de la demande est justement de modifier la composition de l'huile.

Niveaux de consommation de l'huile estimés

L'huile issue du MON87769 est destinée à remplacer l'huile de poisson ou des produits riches en acides gras polyinsaturés omega-3. Le pétitionnaire estime que l'huile sera incorporée dans une grande variété de produits : pâtisseries et produits de panification, céréales de petit déjeuner, fromages, analogues de produits laitiers, margarines, sauces salade, huiles, poissons et produits dérivés, desserts lactés glacés, produits céréaliers et pâtes, crèmes et sauces, produits carnés, laitiers, noix, produits à base de volaille, jus de fruits industriels, légumes cuisinés, gâteaux, snacks, confiseries et soupes. Ainsi, il estime que l'huile serait incorporée à hauteur de 1,8g (pour celle contenant 20 % de SDA) ou 1,3g (pour celle contenant 30 % de SDA) par portion, ce qui correspond à un apport de 375 mg de SDA par portion.

Le pétitionnaire précise que du fait de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés, l'huile issue du MON 87769 est instable et s'oxydera facilement lors de fritures, de ce fait, il considère que l'huile ne peut être utilisée pour la friture.

L'Afssa souligne qu'il existe une incertitude sur la liste des aliments dans lesquels l'huile sera incorporée. Elle considère que l'huile de soja issue du MON 87769 ne devrait être utilisée que par substitution aux matières grasses végétales ajoutées lors du procédé de fabrication, afin d'éviter une augmentation de la teneur en matière grasse et une uniformisation du profil d'acides gras des produits alimentaires qui pourrait avoir lieu si les acides gras naturellement présents dans les

aliments sont substitués à d'autres (comme pour les produits laitiers). Ainsi, un grand nombre de vecteurs proposés ne rentre pas dans ces critères.

De manière générale, l'Afssa considère qu'un statut en acides gras optimal peut être atteint sans l'usage de cette huile de soja, en utilisant les sources classiques telles que les huiles de colza, noix (pour le précurseur de la série d'acides gras n-3) et les poissons gras (pour les dérivés à longue chaîne). De ce fait, l'Afssa considère que la démarche de mettre de l'huile de soja dans des aliments vecteurs tels que yaourts, lait, barres de céréales etc ne semble pas convaincante. L'Afssa ajoute que la démarche n'apparaît pas convaincante non plus en termes d'éducation nutritionnelle.

(7.8) Toxicologie

Évaluation de la sécurité des protéines PjΔ6D et NcΔ15D

La sécurité des protéines est basée sur les données suivantes :

1. Les protéines PjΔ6D et NcΔ15D présentent une homologie de séquence plus ou moins importante avec des protéines de la même famille qui sont très répandues dans de nombreux végétaux ayant un historique de consommation en alimentation humaine.
2. Une analyse *in silico* réalisée à l'aide du logiciel FASTA indique que les protéines PjΔ6D et NcΔ15D ne présentent aucune homologie de séquence avec des protéines toxiques connues qui sont répertoriées dans les banques de données actualisées.
3. Ces protéines, purifiées à partir de graines immatures de soja MON 87769, n'induisent pas de mortalité chez la souris à la dose maximale administrée par voie orale (gavage) de 4,7 mg / kg pour PjΔ6D et de 37,3 mg / kg pour NcΔ15D. Ces études ont été réalisées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoires.

Toutefois, les doses administrées aux animaux au cours de l'étude de toxicité aiguë apparaissent très faibles au regard des recommandations OCDE pour de telles études (OCDE 420). De plus, des données chiffrées d'exposition à des désaturases de la même famille seraient nécessaires afin d'établir l'historique de consommation en alimentation humaine.

(7.8.2) Evaluation de constituants nouveaux autres que les protéines nouvellement exprimées.

Dans la mesure où le profil lipidique de ce soja est profondément différent d'un soja conventionnel, conformément à l'objectif de la modification génétique proposée, l'huile de soja extraite de la graine de soja MON89769 apparaît être un nouvel ingrédient qui aurait du être caractérisé comme tel.

(7.8.3) Informations sur les constituants naturels présents dans l'alimentation humaine et animale

Métabolisme du SDA

L'acide stéaridonique est un intermédiaire métabolique entre l'acide alpha-linolénique et l'EPA et le DHA. Le SDA n'est pas rétroconverti en acide alpha-linolénique, mais peut être converti en EPA. Le pétitionnaire estime que puisqu'une minorité du SDA est convertie en EPA et que le SDA ne s'accumule pas dans les tissus, la voie prioritaire du SDA doit être la beta-oxydation. Cette considération repose sur une seule étude qui montre une bioconversion du SDA en EPA de l'ordre de 20-30 % (James *et al.*, 2003). Il est à noter que dans cette étude, le SDA est apporté sous forme d'esters éthyliques et non pas sous forme de triglycérides comme c'est le cas pour l'huile issue du soja MON 87769.

L'Afssa considère qu'un apport d'acide stéaridonique augmente la disponibilité de l'EPA et par conséquent répond aux recommandations nutritionnelles préconisant d'augmenter l'apport d'EPA et de DHA dans l'alimentation. Toutefois, le DHA n'est pas augmenté de façon significative, ce qui amoindrit l'intérêt nutritionnel de cet ingrédient.

Evaluation du risque lié à la consommation de SDA

Le pétitionnaire rappelle que de nombreuses sources d'acide stéaridonique sont régulièrement consommées : huiles de poisson, algues alimentaires, huile de pépin de cassis ou d'Echium. Il souligne de plus que l'huile d'Echium contenant au moins 10 % d'acide stéaridonique a été autorisée dans l'Union européenne en tant que nouvel ingrédient¹. Il en conclut que le SDA a une histoire de consommation sans risque.

¹ Décision de la Commission du 27 Juin 2008 autorisant la mise sur le marché d'huile d'Echium raffinée, en tant que nouvel ingrédient alimentaire en application du règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil (2008/558/CE). Official Journal of the European Union, L180/19 , 9.7.2008.

De plus, il rapporte 7 études chez le volontaire sain dans lesquels les sujets ont consommé des produits contenant du SDA, mais pas directement l'huile issue du soja MON 87769. Dans ces études, les sujets ont consommé de 0,8 à 62 mg/kg de poids corporel/jour de SDA (soit de 48 mg à 3,72 g/jour pour un homme de 60 kg) pendant 2 à 12 semaines. Le nombre de sujet variait de 11 à 15. Aucune de ces études n'a mis en évidence d'effet délétère du SDA. Cependant, ces études n'avaient pas pour objectif de rechercher de tels effets.

Le pétitionnaire rapporte également 5 études chez l'animal (souris, rat, chien) où les niveaux d'apport testés allaient jusqu'à 1,04 g/kg de poids corporel/jour chez le rat. Aucune de ces études n'a mis en évidence d'effet délétère du SDA.

Une huile de soja riche en SDA a fait l'objet d'une évaluation toxicologique (étude de toxicité 28 jours, 90 jours et études de reprotoxicité) récemment publiée (Hammond *et al.*, 2008). Elle fixe une NOAEL pour le SDA à 0,6 g/kg/jour, ce qui correspond à la plus forte dose testée.

Les éléments permettant d'établir que l'huile ayant fait l'objet de ces travaux expérimentaux est similaire à celle issue du soja MON87769 ne sont pas présentés. Dans ces conditions, l'Afssa considère qu'il n'est pas possible d'extrapoler les données de sécurité existantes à l'huile dérivée de la graine de soja MON87769.

Dans un précédent avis sur la sécurité d'emploi d'huile d'Echium raffinée en tant qu'ingrédient, l'Afssa estimait que « des apports totaux en SDA de 1,9 g/jour apparaissent sans danger » pour l'Homme (Afssa, 2007).

(7.8.4) Étude de toxicité sub-chronique

Une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours a été réalisée chez le rat selon un protocole conforme aux lignes directrices internationales et aux Bonnes Pratiques de Laboratoires. Trois groupes de vingt animaux par sexe ont été soumis à une alimentation contenant soit 15 % de tourteau de soja MON87769, soit 15% de tourteau de soja témoin A3525, soit 15% d'un mélange de tourteau de soja (5% de soja MON87769 et 10% de soja témoin A3525).

La composition chimique des graines et des régimes a été déterminée et leur analyse ne révèle pas de différence significative.

Après analyse statistique (ANOVA) des données, les paramètres toxicologiques mesurés des animaux ayant reçu le soja MON87769 ne sont pas différents de ceux des animaux ayant reçu le soja témoin. De même, l'analyse histologique des tissus prélevés en fin d'étude ne révèle aucune anomalie attribuable à l'administration de tourteau de soja MON87769. Les quelques variations observées sont sporadiques, non dose-dépendantes et restent dans l'intervalle des valeurs historiques de cette souche. Les résultats de l'étude permettent de conclure que l'administration quotidienne pendant 90 jours de tourteau délipidé de soja MON87769 aux doses maximales administrées (soit 12,6 g/kg/jour pour les femelles et 10,9 g/kg/jour pour les mâles) n'induit pas d'effet toxique dans les conditions expérimentales de l'étude. La Dose sans Effet Néfaste Observé (NOAEL) est de 10,9 g/kg/jour de farine délipidée issue de soja MON 87769.

Cette étude permet uniquement d'apprécier la sécurité de la fraction délipidée de la graine, alors que la fraction la plus modifiée et destinée à l'alimentation humaine, l'huile n'est pas présente dans le matériel végétal testé. Cette étude aurait dû porter sur la totalité de la graine non délipidée (graine entière cuite) afin de pouvoir évaluer les effets potentiellement « non attendus » de la modification génétique sur la composition de la graine dans sa totalité.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité des protéines PjΔ6D et NcΔ15D est basée sur les critères suivants :

- La source des protéines d'intérêt ;
La primevère (*Primavera*) et le champignon *Neurospora* (*Neurospora crassa*) sont des organismes qui n'ont jamais été décrits comme étant à l'origine d'allergies.
- L'absence d'homologie de séquence des protéines avec des protéines toxiques ou allergènes connus ; l'homologie a été réalisée sur des banques mises à jour en 2009 (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) ;
- L'absence de glycosylation de ces protéines ;
- La rapide dégradation *in vitro* des protéines en milieu gastrique et intestinal simulé.

Ces travaux réalisés en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoires démontrent que la protéine PjΔ6D est totalement dégradée en moins de 2 minutes en milieu gastrique simulé.

Cependant, des peptides (3.5– 5kDa) dont l'analyse montrait qu'ils n'appartenaient à la désaturase PjΔ6D sont résistants à la digestion. Les résultats d'une nouvelle étude couplant la digestion initiale à une digestion en milieu intestinal simulé démontrent que dans ces conditions expérimentales, la protéine PjΔ6D, y compris les peptides résiduels sont totalement dégradés en moins de 5 minutes. Des travaux similaires sur la protéine NcΔ15D démontrent que celle-ci est totalement dégradée en moins de 30 secondes en milieu gastrique simulé. Des peptides (12 - 17 kDa) dont l'analyse ne permet pas d'établir l'origine restent résistants à la digestion. Les résultats d'une nouvelle étude couplant la digestion initiale à une digestion en milieu intestinal simulé démontrent que, la protéine NcΔ15D, y compris les peptides résiduels sont totalement dégradée en moins de 30 secondes. Au regard de ces éléments, l'existence d'un potentiel allergénique de ces deux protéines ne peut être suspectée.

Il convient toutefois de noter que ces données ne suffisent pas, pour autant, à conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.

(7.10) **Evaluation nutritionnelle**

Evaluation nutritionnelle du tourteau chez l'animal

Une étude d'alimentarité a été réalisée chez des poulets (5 mâles et 5 femelles par cage, 10 répétitions par traitement, 8 traitements soit 800 poulets au total) nourris pendant 42 jours avec deux régimes, un régime de "démarrage", un régime de "croissance/finition" contenant respectivement 31% et 35% de tourteau toasté de soja génétiquement modifiés MON87769 ou de soja témoin quasi isogénique ou de six variétés de soja commerciales non transgéniques. Dans cette étude, la valeur nutritionnelle du tourteau de soja MON87769 a été comparée au tourteau de soja témoin ainsi qu'aux six variétés de soja commerciales.

L'analyse comparée (énergie métabolique, protéines totales, lipides totaux, acides aminés, fibres, taux d'humidité) des matières premières a été réalisée. La fraction de soja est celle utilisée normalement pour les animaux. Elle est délipidée et contient essentiellement des protéines. Les concentrations des substances anti-nutritionnelles, inhibiteurs de trypsine, lectine, acide phytique ont également été mesurées. L'absence de pesticide et de mycotoxine a été vérifiée pour tous les sojas. Les résultats de cette analyse montrent qu'il n'y a pas de différence de composition entre les différents lots de tourteaux de soja utilisés.

L'analyse des contenus en acide gras de l'aliment fait apparaître la présence à l'état de traces de plusieurs acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans l'extrait dérivé du MON87769 mais pas dans ceux des autres variétés. Il s'agit de résidus d'acides gras qui n'ont pas été complètement éliminés par le processus de délipidation.

La composition des 2 régimes alimentaires (démarrage, croissance /finition) est présentée pour chaque soja utilisé. Ils sont identiques, bien équilibrés et montrent une formulation en accord avec les recommandations internationales pour le poulet en croissance.

Le taux de mortalité des animaux nourris avec le maïs transgénique est de 8,33% pour la période 0-7 jours et de 2% entre 7-42 jours de mortalité. Il se situe dans la moyenne des taux observés pour les autres groupes.

Les résultats, après analyse statistique (ANOVA), ne montrent pas de différence entre les animaux nourris avec les tourteaux de soja et les tourteaux de soja témoins en ce qui concerne les performances de croissance et de consommation (5 paramètres), les rendements de carcasse (carcasse entière, tissu adipeux abdominal, muscles pectoraux, cuisses, ailes), l'analyse de la composition de la viande (muscles pectoraux et cuisse).

Sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure que la consommation de tourteaux de soja MON87769 par des poulets en croissance n'induit pas de différence significative sur la croissance et sur les caractéristiques de carcasse comparativement à des poulets ayant reçu du tourteau de soja non génétiquement modifié.

Toutefois la présente étude étant réalisée à partir d'une fraction délipidée de la graine de soja, il n'est pas possible à partir de celle ci de conclure à l'équivalence nutritionnelle de la graine entière ou de l'huile de soja issue de la graine MON87769 dont la teneur en acide gras est modifiée.

Par ailleurs, le pétitionnaire revendique l'utilisation de la graine et des produits dérivés de la graine pour augmenter les teneurs en acides gras oméga 3 des produits animaux. Aucune étude sur les

modifications du profil d'acides gras (notamment SDA, acides gras oméga 3 et dérivés *trans*) des viandes et autres produits issus des animaux ayant consommé la graine ou ses dérivés n'est présentée. Dans la mesure où ces produits animaux sont destinés à la consommation humaine, ces modifications devraient faire l'objet d'une évaluation.

Evaluation nutritionnelle du risque lié à la consommation de l'huile dérivée de soja MON87769 chez l'Homme.

Une étude de simulation a été réalisée sur la base des données de consommation au Royaume-Uni pour évaluer l'exposition de l'homme adulte en acide stéaridonique suite à l'incorporation d'huile dérivée de MON87769 dans les aliments pris en compte en §7.7, à hauteur de 375 mg de SDA par portion. Dans cette étude, il est fait l'hypothèse que tous les produits cibles contiennent de l'huile de soja dérivée du MON87769 et que l'aliment cible contenant l'huile est systématiquement consommé. Cette étude estime le niveau d'apport moyen en SDA chez l'adulte à 2,5 g/jour et à 5,6 g/jour chez l'homme adulte au 97,5^{ème} percentile, ce qui correspond, d'après le pétitionnaire, à des niveaux d'EPA de 400 - 800 mg et 1,0 - 1,8 g respectivement.

L'Afssa souligne que les niveaux d'apport n'ont pas été évalués chez l'enfant, alors que l'huile issue du soja MON87769 est destinée à être incorporée dans une grande variété d'aliments incluant des aliments préférentiellement consommés par les enfants (céréales de petit déjeuner, confiseries, gâteaux, etc.). Cette évaluation est d'autant plus nécessaire chez l'enfant que l'équilibre du rapport entre l'acide arachidonique et l'EPA est tout particulièrement important. Par ailleurs, les simulations n'ont pas pris en compte les apports en SDA par le biais du reste de l'alimentation, or certaines huiles végétales (pépin de cassis et echium) en contiennent des doses non négligeables. D'autre part, les viandes et autres produits issus des animaux ayant consommé la graine de soja MON 87769 ont probablement une teneur en SDA plus élevée que les produits animaux traditionnels considérés dans cette étude de simulation. L'enrichissement en SDA des produits animaux devrait de ce fait être pris en compte dans l'étude de simulation.

L'Afssa considère que les niveaux d'apport en SDA estimés par cette étude dépassent largement les 1,9 g/jour évalués comme sans risque par l'Afssa. De plus, les voies métaboliques du SDA sont mal connues et l'effet d'apports de SDA aussi élevés est difficilement prévisible, et ce, d'autant plus en cas d'apports en EPA et DHA élevés.

Le pétitionnaire appuie son argumentaire sur la sécurité d'utilisation de l'huile issue du soja MON87769 sur la base de l'évaluation de la sécurité de l'huile d'Echium. Par comparaison, les niveaux d'incorporation autorisés pour l'huile d'Echium sont compris entre 75 mg/100g et 750 mg/100g selon les aliments. Les vecteurs autorisés parmi les aliments courants sont moins nombreux que les vecteurs proposés dans le présent dossier (produits à base de lait, préparations fromagères, pâtes à tartiner et assaisonnements, céréales de petit déjeuner, compléments alimentaires, aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales, denrées alimentaires destinées à être utilisés dans les régimes hypocaloriques destinés à la perte de poids). Les niveaux d'apport estimés suite à l'incorporation de l'huile d'Echium dans les aliments vecteurs proposés, s'élevaient à 2,2 g/jour pour le 97,5^{ème} percentile. Ces niveaux ont été diminués après réduction du nombre d'aliments dans lesquels l'huile d'Echium est autorisée. L'Afssa estime donc que le pétitionnaire ne peut se baser sur l'autorisation de mise sur le marché de l'huile d'Echium, ni sur l'historique de consommation, pour justifier la sécurité d'emploi d'huile issue du MON 87769 à ces niveaux d'utilisation.

CONCLUSION

Le soja est une plante utilisée pour l'alimentation animale et la production de protéines, de lécithines et d'huile pour l'alimentation humaine. Le soja MON87769 a été modifié génétiquement pour permettre d'enrichir les graines de soja et l'huile dérivée en SDA, un acide gras polyinsaturé de la série des oméga-3.

La caractérisation moléculaire du soja MON87769 est complète et son analyse suggère que l'insertion du transgène n'est pas de nature à entraîner d'effet néfaste.

Les données comparatives de composition permettent de conclure qu'il n'y a pas de différence de composition entre le soja MON87769 et son témoin, des fractions délipidées de la graine de soja (tourteaux, isolat de protéines) et des lécithines. Des différences de composition sont mises en évidence dans la graine et l'huile et concernent les acides γ -linoléique et stéaridonique, principalement, comme attendu suite à la modification génétique réalisée.

Concernant les données de sécurité relatives à la présence des protéines nouvellement exprimées Pj Δ 6D et Nc Δ 15D, l'Afssa considère que les doses utilisées dans les études de toxicité aiguës sont très inférieures aux doses habituellement mises en œuvre dans une telle étude.

Cependant, au regard des résultats de l'ensemble des études dont ceux de l'étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat réalisée à partir des tourteaux de soja, l'Afssa considère que cette fraction délipidée de la graine destinée à l'alimentation animale, présente le même niveau de sécurité sanitaire que le tourteau issu de la graine de soja témoin ou de soja conventionnel.

La sécurité de la graine du soja MON87769 dans sa globalité ne peut être évaluée en l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours réalisée sur un matériel végétal comprenant la fraction lipidique (ex. graine entière toastée non délipidée) dont la composition est modifiée par rapport au témoin.

Concernant l'huile issue de la graine de soja MON87769, sa composition est modifiée et contient des acides gras supplémentaires (SDA, GLA, *trans* SDA et *trans* ALA) absents dans l'huile issue du soja conventionnel. Aucune huile ou aliment consommé à ce jour, ne contient des teneurs en SDA aussi élevées que l'huile proposée par le pétitionnaire. En effet, l'huile d'Echium autorisée contient environ 10 % de SDA, soit deux à trois fois moins que l'huile issue du soja MON87769. De ce fait, l'Afssa estime que l'huile issue du soja MON 87769 doit être considérée comme un nouvel ingrédient destiné à l'alimentation humaine et évaluée, en conséquence, selon le règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients.

En particulier, l'Afssa estime que, pour évaluer la sécurité d'utilisation de l'huile issue du soja MON87769 dans les conditions proposées, le dossier devrait notamment comporter les éléments suivants :

- les différents procédés d'extraction et de raffinage ainsi que leurs conséquences sur la stabilité des acides gras ;
- la liste précise des produits vecteurs et des données de stabilité de l'huile dans ces aliments ;
- des données sur le devenir métabolique du SDA. Une éventuelle accumulation d'acide stéaridonique devrait être étudiée dans les cas des niveaux d'apport élevés en SDA et/ou en ses dérivés EPA et DHA ;
- les effets des isomères *trans* du SDA ;
- une évaluation des modifications en acide gras des produits issus des animaux ayant consommé la graine de soja MON87769 ou ses dérivés ;
- des études sur la sécurité de consommation du SDA à un niveau de 5 g/jour, correspondant au niveau d'apport maximal estimé suite à l'incorporation de l'huile dans l'alimentation, ce niveau étant nettement supérieur aux 1,9 g/jour considérés comme sans risque par l'Afssa (Afssa, 2007) ;
- des études de simulation des niveaux de consommation de SDA prenant en compte l'enrichissement des produits animaux en SDA attendu suite à l'incorporation de graine de soja MON87769 dans leur alimentation ;

- des études de simulation des niveaux de consommation de SDA réalisées chez l'enfant dans la mesure où un certain nombre d'aliments vecteurs leur serait destiné, notamment par rapport au risque de déséquilibre de la balance entre les apports en acide arachidonique (C20 :4 n-6) et en EPA.

REFERENCES

Afssa (2007). Avis du 20 septembre 2007 relatif à l'évaluation du rapport initial établi par les autorités britanniques et relatif à l'emploi d'huile d'Echium raffinée issue d'Echium *plantagineum* en tant qu'ingrédient, au titre du règlement CE n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires.

Hammond B. G., Lemen J. K., Ahmed G., Miller K.D., Kirkpatrick J. and Fleeman T. (2008). Safety assessment of SDA soybean oil: Results of a 28-day gavage study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats, *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 52, 311-323.

James M. J., Ursin V. M. and Cleland L. G. (2003). Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *American journal of Clinical Nutrition*, 77, 1140-1145.

MOTS-CLEFS

OGM, Soja, Acide stéaridonique, oméga 3, Nouvel ingrédient.

Le directeur général

Marc MORTUREUX