

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 9 septembre 2011

AVIS

en réponse à la saisine¹ **110310-saisine HCB- dossiers culture**
concernant notamment le dossier **EFSA-GMO-NL-2005-24**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 23 mars 2011 par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2005-24 concernant l'autorisation de la culture du soja génétiquement modifié 40-3-2 dans l'Union européenne.

Ce dossier a été déposé par la société Monsanto dans le cadre du Règlement (CE) 1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments via les Autorités compétentes hollandaises, sous la référence **EFSA-GMO-NL-2005-24**. La saisine du HCB correspondante est référencée **110310-saisine HCB- dossiers culture**.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 14 juin 2011 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès.

¹ La saisine « **110310-saisine HCB- dossiers culture** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS ainsi que les rapporteurs externes ayant contribué à l'élaboration de l'avis sont indiqués dans l'Annexe 2.

RESUME DE L'AVIS³

La saisine reçue par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) porte sur l'évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2005-24. Ce dossier, déposé par la société Monsanto, correspond à une demande d'autorisation de la culture du soja génétiquement modifié 40-3-2⁴ dans l'Union européenne. Le soja 40-3-2 fait par ailleurs l'objet d'une procédure de renouvellement d'autorisation pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale.

Description du produit

Le soja génétiquement modifié 40-3-2 exprime l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase de la souche CP4 d'*Agrobacterium* (CP4 EPSPS), qui lui confère la tolérance au glyphosate, ingrédient actif d'herbicides non sélectifs. La cassette d'expression transgénique permettant l'expression du gène *cp4 epsps* est présente en un locus d'insertion et en une copie complète unique. L'insertion n'interrompt pas de séquences codantes ou régulatrices connues ou reconnaissables. Le caractère est stable au cours des générations d'auto-fécondations et de croisements. Aucun autre transgène que *cp4 epsps* n'est présent dans le soja 40-3-2.

Le CS du HCB note que les performances agronomiques du soja 40-3-2 ont fait l'objet de rapports contradictoires, notamment concernant l'existence d'une dépression de rendement.

Impact sur la santé humaine et animale

L'innocuité de la protéine CP4 EPSPS a été établie compte tenu de l'historique de son usage, et notamment de (1) l'innocuité pour les mammifères de la bactérie donneuse du gène (souche CP4 d'*Agrobacterium*), (2) la similarité de la protéine CP4 EPSPS exprimée par le soja 40-3-2 avec les protéines EPSPS ubiquistes présentes dans les algues, les plantes à usage alimentaire et les micro-organismes tels que les levures et les bactéries, dont la consommation n'a jamais révélé de conséquences délétères pour la santé, (3) l'absence d'homologie de séquence des protéines CP4 EPSPS avec des toxines connues ou des protéines possédant une activité pharmacologique, répertoriées dans les bases de données, (4) l'absence de détection d'effets négatifs dans les tests de toxicité orale aiguë, (5) le poids de l'évidence en faveur d'une absence d'allergénicité.

Les études de tolérance du soja 40-3-2, menées sur 4 et 13 semaines chez le rat, n'ont pas mis en évidence d'effets cliniques, d'altérations de la consommation alimentaire, de la croissance pondérale, ni d'anomalies histologiques des principaux organes. L'étude de tolérance menée sur des souches de rats et de souris communément utilisées comme modèles d'étude de l'allergénicité et de l'immunotoxicité n'a pas mis en évidence d'effets cliniques associés à une réaction allergénique ou immunotoxique à ce soja.

Les études d'alimentarité menées sur le poulet, la vache laitière, le porc et le poisson chat, consommant des régimes renfermant du soja 40-3-2 ou du soja témoin quasi-isogénique, n'ont pas mis en évidence d'effets sur la consommation alimentaire, ni d'altérations de croissance pondérale, de qualité de production ou de composition de chair.

Le CS du HCB note toutefois que seuls des tests statistiques individuels de comparaison sont mis en œuvre. Les recommandations de l'AESA qui permettraient de conclure éventuellement à l'équivalence (EFSA, 2010) ne sont pas suivies : aucune étude de puissance n'est proposée et aucun test d'équivalence n'est réalisé.

Le CS du HCB note également que les analyses comparatives du dossier ne sont pas conformes aux nouvelles recommandations spécifiques de l'AESA (EFSA, 2011) pour l'évaluation des plantes GM tolérantes aux herbicides en ce qu'elles ne prennent pas toujours en compte le traitement aux herbicides.

³ Ce résumé ne se substitue pas à l'analyse du dossier développée dans cet avis.

⁴ Le terme de soja 40-3-2 désigne la lignée de soja 40-3-2 d'origine ainsi que toute lignée contenant l'événement 40-3-2 obtenue par autofécondation ou croisement avec la lignée 40-3-2 d'origine.

Risques de dissémination et impact sur l'environnement

1. Dissémination

Le risque de dissémination du transgène vers d'autres plantes est un point à considérer dans le cadre de la coexistence entre les filières GM et non GM plutôt qu'en termes d'impact sur l'environnement. En cas de dissémination, il est important de noter que le caractère introduit ne confère aucun avantage compétitif en l'absence de traitement aux herbicides à base de glyphosate.

Le potentiel de dissémination du transgène par les graines est très faible, du fait des conditions thermiques élevées requises pour la germination et le développement du soja, et du fait de la nécessité d'inoculum de bactérie fixatrice d'azote de l'atmosphère pour le développement optimal des plantules. Le risque d'installation de populations férales⁵ ou de repousses de soja est donc très faible en Europe. Cette affirmation est à nuancer dans certains DOM-COM où le climat est plus propice aux repousses de soja.

La probabilité de dissémination du transgène par le pollen vers d'autres espèces est nulle en Europe car aucune espèce sauvage sexuellement compatible avec le soja ne s'y trouve.

La dissémination du transgène par le pollen vers d'autres cultures de soja est très peu probable, considérant le taux d'autogamie très élevé de l'espèce. Il faut cependant noter que ce taux dépend du niveau de cléistogamie, lui-même variable selon les variétés. Il est aussi probable que le niveau d'allogamie et l'échelle de dispersion spatiale du pollen varient en fonction de la faune pollinisatrice présente dans la zone de culture.

Le risque de transfert horizontal du transgène vers des bactéries est extrêmement limité, et de tels événements, s'ils survenaient, n'auraient aucune conséquence sur la structure des communautés bactériennes environnementales et les fonctions réalisées par ces bactéries.

2. Impact de l'utilisation de glyphosate dans l'itinéraire de culture du soja 40-3-2

Bien que le pétitionnaire souligne que la culture du soja 40-3-2 ne nécessite pas de traitement au glyphosate, le CS du HCB a analysé les conséquences d'une utilisation probable du glyphosate par les agriculteurs dans l'itinéraire de culture du soja 40-3-2.

Sans préjuger de l'analyse à venir de l'Anses sur les risques pour la santé et l'environnement de l'utilisation d'un herbicide à base de glyphosate sur les variétés de soja 40-3-2 dans le cadre d'une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un produit phytopharmaceutique à base de glyphosate à des fins de désherbage de soja cp4 epsps⁶ en France, le CS du HCB note que ces systèmes de culture ont eu pour conséquences dans le passé :

- le développement d'adventices résistantes au glyphosate. Le CS du HCB précise que le risque de sélectionner des génotypes résistants à l'herbicide parmi les espèces adventices associées à la culture traitée est inhérent à toute utilisation d'herbicide. Ce risque peut être accru par de mauvaises pratiques agricoles rendues possibles par toute culture de plantes tolérantes à des herbicides. De plus, ce risque n'est pas un risque direct pour l'environnement, mais un risque de diminuer l'efficacité des herbicides pour les agriculteurs, qui devront faire appel à des pratiques alternatives de gestion des mauvaises herbes avec un impact potentiellement plus important sur l'environnement ;
- une réduction du travail du sol. L'utilisation de glyphosate sur des variétés tolérantes facilite l'adoption de pratiques culturales nécessitant moins de travail du sol, ce qui est souvent associé à des effets bénéfiques pour l'économie et l'environnement. Des effets négatifs ont également été signalés dans le cas d'une absence totale de labour, indiquant que certains sols, certaines régions, ne sont pas appropriés pour ce type de pratiques agricoles ;
- des effets inattendus, associés à l'application du glyphosate sur le soja 40-3-2. Des effets négatifs transitoires ont été rapportés sur la nodulation et l'efficacité de la fixation d'azote

⁵ Se dit d'animaux ou plantes qui de l'état de culture ou de domesticité sont repassés à l'état sauvage.

⁶ Variétés de soja rendues tolérantes au glyphosate par l'expression de la protéine modifiée CP4 EPSPS

des plantes traitées. Des effets contrastés ont été observés sur des agents de maladies racinaires du soja. L'impact sur la biodiversité est également complexe, incluant des effets positifs associés à la réduction du travail du sol, et des effets négatifs associés à l'efficacité de l'élimination des adventices dans les champs.

Mesures propres à assurer la coexistence des filières

Des mesures propres à permettre la coexistence des filières de soja non transgéniques avec le soja génétiquement modifié 40-3-2, s'il était autorisé à la culture, devraient être appliquées au titre de la coexistence des filières selon la loi n° 2008-595 du 25 juin 2008.

La contamination par pollinisation de soja non transgénique est peu probable compte tenu de la forte autogamie des plantes de soja, comme mentionné ci-dessus. La contamination de soja non transgénique par des repousses de soja 40-3-2 est improbable en Europe considérant que l'espèce est gélive. Dans certains DOM-COM, le climat est toutefois plus favorable aux repousses de soja et les conditions de coexistence seraient à envisager différemment.

Conformément au Règlement (CE) 1829/2003, des méthodes de détection et de quantification du soja 40-3-2 ont été fournies par le pétitionnaire et validées par le CRL-GMFF (EURL-GMFF)⁷. Du matériel de référence certifié est disponible auprès de l'IRMM⁸ et des revendeurs. L'identifiant unique communautaire MON-Ø4Ø32-6 a été attribué au soja 40-3-2.

Plans de surveillance post-commercialisation

- Plan de surveillance spécifique

N'ayant pas identifié de problème particulier lié à la culture de ce soja, le pétitionnaire ne prévoit pas de plan de surveillance spécifique. Le CS du HCB souhaite que le risque de développement d'adventices résistantes au glyphosate fasse l'objet d'une surveillance spécifique.

- Plan de surveillance générale

La surveillance générale proposée par le pétitionnaire reprend les formulations classiques de surveillance reposant sur des questionnaires distribués aux opérateurs, une implication des réseaux de surveillance existants, des programmes d'accompagnement spécifique, et une veille bibliographique.

Le CS du HCB demande que :

- le pétitionnaire centralise les données recueillies dans une base centrale de données avec SIG⁹, si possible connectée à des bases de données du Centre Commun de Recherche de la Commission européenne ;
- le pétitionnaire se rapproche des Autorités compétentes afin d'établir un plan de surveillance générale des santés humaine et animale ;
- le questionnaire inclue des questions plus explicites concernant les itinéraires de culture des agriculteurs (notamment les programmes d'herbicides et le travail du sol) ;
- le pétitionnaire et les Autorités compétentes examinent les risques environnementaux potentiels même si le taux de réponses aux questionnaires mentionnant des effets indésirables liés à la culture de soja 40-3-2 est inférieur à 5 % ;
- le pétitionnaire étende le plan de surveillance générale au-delà de la durée d'autorisation ;

⁷ Community Reference Laboratory for GM Food and Feed of the Joint Research Centre, Laboratoire de référence communautaire du Centre de recherche commun de la Commission Européenne, instauré par le Règlement (CE) 1829/2003, appelé maintenant l'EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed : http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-gmff).

⁸ Institute for Reference Materials and Measurements : l'un des sept instituts du laboratoire de référence communautaire, <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/homepage.htm>.

⁹ Système d'information géographique capable d'organiser et de présenter des données spatialement référencées.

- le pétitionnaire apporte toute information disponible de biosurveillance qu'il aurait pu diligenter au cours des 16 ans de culture du soja 40-3-2 en Amérique du Nord ou dont il aurait connaissance.

En conclusion

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB retient que :

- aucun effet particulier de toxicité ni d'allergénicité n'a été observé par le pétitionnaire dans les analyses expérimentales et bioinformatiques de la protéine CP4 EPSPS et du soja 40-3-2. Les études d'alimentarité n'ont pas détecté de différences entre le soja 40-3-2 et son équivalent quasi isogénique non transgénique. Le CS du HCB note que le pétitionnaire conclut à l'équivalence du soja 40-3-2 et son comparateur non transgénique sans avoir mis en œuvre les tests d'équivalence et études de puissance appropriés. Ces informations seront exigées à l'avenir, conformément aux nouvelles lignes directrices sur l'analyse statistique de l'AESA (EFSA, 2010) ;
- aucun impact négatif direct du soja 40-3-2 sur l'environnement n'a été identifié ;
- des effets indirects, dus à l'application du glyphosate sur le soja 40-3-2, ont été rapportés dans la littérature. Ces effets, complexes, contrastés et parfois contradictoires, appellent des recherches supplémentaires, et un suivi attentif durant la culture du soja 40-3-2. Le CS du HCB note que le glyphosate est inscrit à l'annexe I de la Directive 91/414/CEE¹⁰, et que toute demande d'autorisation de mise sur le marché d'un produit phytopharmaceutique contenant du glyphosate à des fins de désherbage de soja cp4 epsps en France fera l'objet d'une évaluation par l'Anses¹¹ ;
- en termes de coexistence avec des cultures de soja non transgénique, la dissémination de gènes par pollinisation est peu probable et le risque de repousses est très faible en Europe continentale. Des méthodes permettant de surveiller la coexistence du soja 40-3-2 avec les filières de soja non transgéniques ont été fournies. Le pétitionnaire devra adapter ces mesures en conformité avec le décret édictant les règles de coexistence.
- des plantes adventices résistantes au glyphosate pourraient se développer en conséquence de mauvaises pratiques agricoles d'utilisation du glyphosate sur le soja 40-3-2. Cette remarque ne concerne pas un impact direct de la modification génétique sur l'environnement, mais souligne le risque de perte d'un outil de gestion des mauvaises herbes, dommageable pour l'agriculteur. Bien que le pétitionnaire ne l'ait pas prévu, le CS du HCB recommande que le risque avéré de développement de plantes adventices résistantes au glyphosate fasse l'objet d'une surveillance spécifique.

Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la culture du soja 40-3-2 soit accompagnée de mesures propres à minimiser ce risque de sélection de plantes adventices tolérantes au glyphosate par un encadrement rigoureux des pratiques d'utilisation de cet herbicide total : les Autorités compétentes pourraient édicter des règles de bonnes pratiques agricoles qui permettraient une utilisation durable d'herbicides à base de glyphosate, soit en accompagnement à la décision d'autorisation de mise sur le marché éventuelle d'une formulation de glyphosate à des fins de désherbage de soja cp4 epsps en France, soit en complément à l'avis du MAAP à tous les détenteurs d'autorisations de mise sur le marché pour des spécialités commerciales à base de glyphosate (NOR : AGRG0402105V) (MAAP, 2004).

¹⁰ Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, mise en application en 1993, et abrogée par le Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 entré en vigueur le 14 juin 2011.

¹¹ Anses : Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	7
2. CARACTERISTIQUES DES PLANTES GENETIQUEMENT MODIFIEES.....	7
2.1 DESCRIPTION DU PRODUIT.....	7
2.2 CARACTERISTIQUES DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE.....	7
2.3 METHODE DE TRANSFORMATION	8
2.4 CARACTERISTIQUES DU SOJA 40-3-2	9
2.5 PERFORMANCE AGRONOMIQUE.....	10
3. EVALUATION DES RISQUES POUR LA SANTE HUMAINE ET ANIMALE	11
3.1 EVALUATION DE LA TOXICITE ET DE L'ALLERGENICITE DE LA PROTEINE CP4 EPSPS.....	11
3.2 EVALUATION DE LA TOXICITE ORALE SUBAIGUE ET DE L'ALLERGENICITE DU SOJA 40-3-2	13
3.3 ETUDE D'ALIMENTARITE DU SOJA 40-3-2	13
3.4 REMARQUES SUR LA PRISE EN COMPTE DU TRAITEMENT HERBICIDE AU GLYPHOSATE.....	14
3.5 CONSIDERATIONS SUR LES ANALYSES STATISTIQUES	14
4. EVALUATION DES RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT	15
4.1 DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE PAR LES GRAINES	15
4.2 DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE PAR LE POLLEN VERS D'AUTRES PLANTES (TRANSFERT DE GENE VERTICAL).....	16
4.3 DISSEMINATION POTENTIELLE DU TRANSGENE VERS LES BACTERIES DU SOL (TRANSFERT DE GENE HORIZONTAL)	18
4.4 EVALUATION DES RISQUES ASSOCIES A L'UTILISATION DE GLYPHOSATE DANS L'ITINERAIRE DE CULTURE DU SOJA 40-3-2.....	19
5. COEXISTENCE DES FILIERES	24
6. PLANS DE SURVEILLANCE POST-COMMERCIALISATION.....	24
7. CONCLUSIONS	26
8. BIBLIOGRAPHIE	27
ANNEXE 1 : SAISINE	33
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	35

1. Introduction

Le dossier EFSA-GMO-NL-2005-24, soumis par la société Monsanto dans le cadre du Règlement (CE) 1829/2003¹² auprès de l'AESA¹³, est une demande d'autorisation de la culture du soja génétiquement modifié 40-3-2¹⁴ dans l'Union européenne. Le soja 40-3-2 fait par ailleurs l'objet d'une procédure de renouvellement d'autorisation pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale. Le dossier correspondant (EFSA-GMO-RX-40-3-2) a été précédemment évalué par le Haut Conseil des biotechnologies (HCB, 2011).

Le HCB est saisi par les Autorités compétentes françaises (le Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire) pour éclairer la position de la France sur l'autorisation de culture de ce soja lors du vote en comité réglementaire (CPCASA) et, en cas d'absence de majorité qualifiée, en Conseil des ministres (Conseil de l'Union européenne). Cet avis est écrit avant publication de l'avis de l'AESA sur ce dossier.

2. Caractéristiques des plantes génétiquement modifiées

2.1 Description du produit

Le soja génétiquement modifié 40-3-2 exprime l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) de la souche CP4 d'*Agrobacterium tumefaciens* (CP4 EPSPS), qui lui confère la tolérance au glyphosate, ingrédient actif d'herbicides non sélectifs.

La toxicité non sélective du glyphosate pour les plantes s'explique par le fait qu'il inhibe la fonction de l'enzyme EPSPS de la majorité des plantes. EPSPS est une enzyme essentielle à la production des acides aminés et autres composés aromatiques chez les plantes, les bactéries et les champignons. Elle n'est pas présente chez les animaux, qui ne synthétisent pas leurs propres composés aromatiques. Plusieurs stratégies ont été déployées pour développer des plantes résistantes au glyphosate. La stratégie la plus utilisée actuellement est l'utilisation du gène *cp4 epsps* de la souche CP4 d'Agrobactérie. Ce gène possède une mutation qui rend l'enzyme produite, CP4 EPSPS, insensible à l'inhibition par le glyphosate. Il s'agit donc de rajouter une copie de ce gène dans les plantes pour maintenir l'activité de la voie métabolique des composés aromatiques tandis que l'enzyme végétale EPSPS endogène est inhibée par le glyphosate (Duke and Powles, 2008; Funke et al., 2006).

2.2 Caractéristiques de la construction génétique

La construction transgénique à l'origine de l'événement 40-3-2 provient du plasmide PV-GMGT04, un dérivé du plasmide pUC119. Ce plasmide de 10505 pb¹⁵ porte trois cassettes d'expression, initialement destinées au transfert dans la plante, ainsi qu'une origine de répllication procaryote et un gène procaryote *nptII* de résistance à la kanamycine lui permettant d'être sélectionné dans *Escherichia coli*.

Deux des cassettes destinées au transfert dans la plante visent à conférer à la plante receveuse une tolérance au glyphosate par une expression maximale de l'enzyme CP4 EPSPS. Cette expression maximale est recherchée par l'utilisation de deux promoteurs

¹² Le Règlement (CE) 1829/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments, consistant en, ou contenant des, ou issus d'organismes génétiquement modifiés, pour l'alimentation humaine et animale.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>

¹³ Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : *European Food Safety Authority*.

¹⁴ Le terme de soja 40-3-2 désigne la lignée de soja 40-3-2 d'origine ainsi que toute lignée contenant l'événement 40-3-2 obtenue par autofécondation ou croisement avec la lignée 40-3-2 d'origine.

¹⁵ Paires de bases.

différents, tous les deux induisant une expression constitutive, pour chacune des constructions :

- soit P-E35S : promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), avec sa région *enhancer*¹⁶ dupliquée afin d'induire une forte expression dans les cellules de plantes,
- soit P-FMV : promoteur du gène 35S du virus de la mosaïque de la scrofulaire (*figwort mosaic virus*, virus génétiquement proche du CaMV).

Le reste de la construction de ces deux cassettes est identique, avec, pour composition :

- CTP4 : séquence amino-terminale d'un peptide d'adressage au chloroplaste provenant de la séquence CTP du gène *epsps* de *Petunia hybrida*. Cet élément permet de diriger la protéine CP4 EPSPS dans le chloroplaste où se déroule la synthèse d'acides aminés aromatiques,
- *cp4 epsps* : la séquence codant la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase de la souche CP4 d'*Agrobacterium*, conférant la résistance au glyphosate,
- NOS 3' : région de polyadénylation du gène de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens*.

La troisième cassette vise à la sélection des transformants par l'expression de la β -glucuronidase (GUS), un marqueur histologique produit par le gène *uidA* d'*E. coli*. Elle est constituée de :

- P-MAS : promoteur du gène *TR2'* de la mannopine synthase d'*A. tumefaciens*,
- *uidA* : séquence codante du gène exprimant la β -glucuronidase d'*E. coli*,
- 7S 3' : région de polyadénylation du gène de la sous-unité alpha du complexe de type 7S (protéine de réserve des graines) du soja.

2.3 Méthode de transformation

Des cellules du cultivar de soja A5403 ont été bombardées de particules d'or sur lesquelles étaient adsorbées des molécules de plasmide PV-GMGT04 (Padgett et al., 1995). Dans cette méthode de transformation, les particules d'or pénètrent dans les cellules, et l'ADN plasmidique qu'elles portent se fragmente une fois relargué dans le cytoplasme et peut s'intégrer à différents endroits du génome végétal (Christou et al., 1988; McCabe et al., 1988). Les cellules issues du bombardement ont été déposées sur un milieu de culture contenant des hormones végétales (auxines et cytokinines) afin d'obtenir des cals clonaux puis des bourgeons. Les bourgeons transformés ont été sélectionnés par un test histochimique colorimétrique caractéristique de l'expression de la β -glucuronidase. Les régénérants transformés (R0) ont été transférés en serre et leurs graines ont été récoltées. Les familles de plantes R1 ainsi obtenues ont été testées et sélectionnées pour leur résistance au glyphosate. La descendance R2 a été récoltée à partir des plantes R1 exprimant les plus fortes résistances au glyphosate (Padgett et al., 1995).

L'analyse de descendance des plantes R2 sélectionnées indique que leur ancêtre R0 contenait deux insertions génétiquement indépendantes, l'une lui conférant la positivité au test histochimique de coloration, l'autre la tolérance au glyphosate. Les données de ségrégation indiquent que la plante 40-3-2 sélectionnée ne possède plus qu'une insertion conférant la résistance au glyphosate, à l'état homozygote, l'autre insertion ayant été perdue par ségrégation (Padgett et al., 1995).

Ce sont les descendants de cette plante 40-3-2, en autofécondation ou par croisement avec d'autres variétés de soja, qui constituent le soja génétiquement modifié 40-3-2 (Padgett et al., 1995).

¹⁶ Enhancer: séquence d'activation de la transcription d'un gène.

2.4 Caractéristiques du soja 40-3-2

- Nombre de sites d'insertion et nombre de copies par insertion

Des analyses moléculaires par Southern Blot, PCR et séquençage, ont permis de déterminer que le génome nucléaire du soja 40-3-2 porte deux sites d'insertion de fragments du plasmide PV-GMGT04 ; ces deux insertions sont génétiquement liées (elles co-ségrègent), et contiennent chacune un fragment unique du plasmide. Le premier correspond à la cassette quasi complète du gène *cp4 epsps* sous le contrôle du promoteur P-E35S ; le second à un fragment du gène *cp4 epsps* (voir structure ci-dessous). Ni les cassettes exprimant le gène *uidA* ou le gène *cp4 epsps* sous le contrôle du promoteur P-FMV, ni les régions correspondant au reste du plasmide PV-GMGT04, dont le gène *nptII*, n'ont été détectées dans le soja 40-3-2.

- Structure des inserts

La structure des inserts est représentée schématiquement dans la Figure 1.

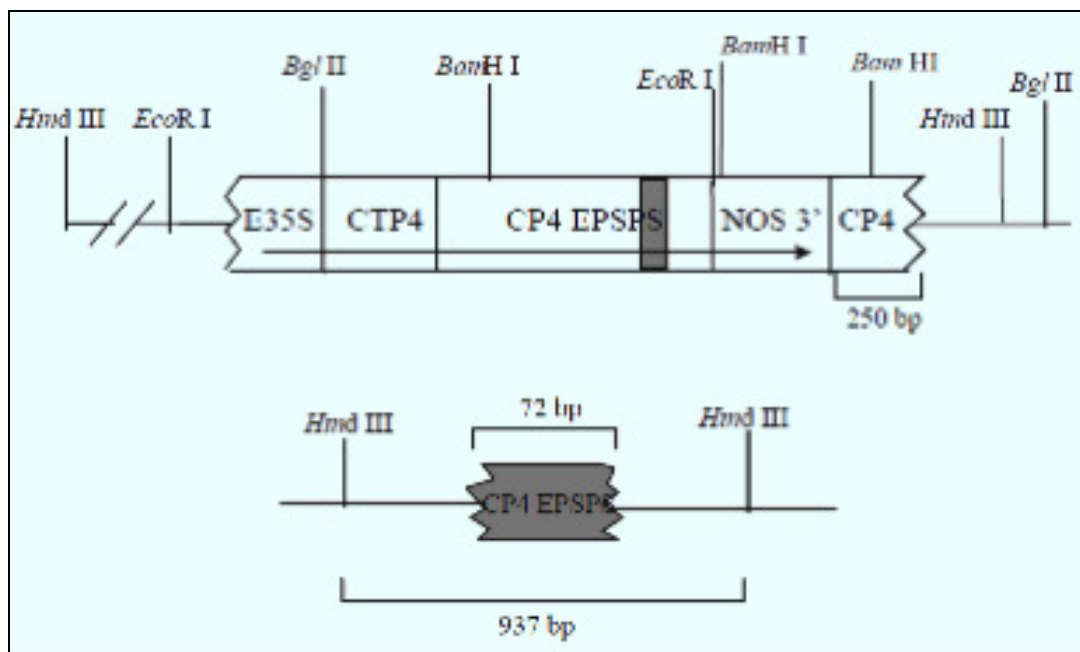


Figure 1. Représentation schématique des inserts présents dans le soja 40-3-2.

Le premier insert est un fragment de 3,2 kb. Il correspond à la cassette d'expression du gène *cp4 epsps* sous le contrôle du promoteur P-E35S. Ce promoteur est tronqué de 354 pb en 5', ce qui résulte en la perte d'un enhancer, mais sans altération du site d'initiation de transcription. L'insert possède aussi un fragment supplémentaire de 250 pb de séquence codante du gène *cp4 epsps*, en position 3' adjacente au terminateur NOS.

Cet insert est fonctionnel : il exprime CP4 EPSPS malgré son promoteur tronqué. Le fragment de 250 pb du gène *cp4 epsps* n'est pas exprimé car il n'est pas sous le contrôle d'un promoteur. Le fragment ne produit pas de protéine de fusion.

Le deuxième insert, de 72 pb, correspond à un fragment de la séquence codante du gène *cp4 epsps* (région grisée sur le premier insert de la figure 1). Ce fragment ne produit pas de protéine de fusion non plus.

- Séquençage des régions flanquantes

Les régions flanquantes des deux insertions ont été séquencées : 186 pb en amont et 534 pb en aval du premier insert, 532 pb en amont et 599 pb en aval du second insert. Ces régions sont constituées d'ADN génomique de soja réarrangé. Des travaux récents ne permettent pas d'identifier de séquences codantes ou de régions régulatrices connues ou reconnaissables dans ces régions, indiquant que l'insertion n'a pas interrompu d'ORF¹⁷ endogène du soja (McClain and Silvanovich, 2008; McClain et al., 2007).

- Stabilité et héritabilité des transgènes et de leur phénotype dans le soja 40-3-2

Des études sur plusieurs dizaines de générations d'autofécondation de soja 40-3-2 ou de croisements à des variétés cultivées pour l'introgession¹⁸ du caractère de résistance au glyphosate, réalisées dans différentes conditions environnementales, montrent que l'événement de transformation 40-3-2 est stable et ségrége comme un marqueur dominant en un locus unique. Cela a été confirmé par Southern blot sur quatre générations successives.

- Analyses bioinformatiques des ORF potentiels présents dans les insertions

L'analyse bioinformatique des 6 cadres de lecture des séquences des insertions et de leurs régions flanquantes ne permet pas de mettre en évidence de régions promotrices ou terminatrices ni d'ORF, de peptides allergènes, de toxines ou de protéines de fusion pouvant résulter de l'expression de ces séquences.

- Expression des transgènes dans le soja 40-3-2

Le promoteur 35S du CaMV ayant la propriété d'induire une expression constitutive, la protéine CP4 EPSPS est *a priori* présente dans tous les tissus de la plante. On la retrouve notamment à un niveau de 0,3 à 0,8 et de 0,2 à 0,4 µg/mg de tissus frais dans les feuilles et les graines du soja 40-3-2, respectivement.

Des expériences de northern blot montrent que des ARN secondaires et minoritaires (dont un de 7,4 kb), contenant la séquence codante de la protéine CP4 EPSPS et les régions 3' de l'insert, sont aussi transcrites dans ce soja, mais à une abondance 75 fois plus faible que l'ARN messager de 1,5 kb correspondant à la protéine CP4 EPSPS. Il est vraisemblable que ces ARN soient le produit d'un fonctionnement partiel du terminateur NOS. Des expériences de western blot montrent que seule la protéine CP4 EPSPS de 46 kDa est détectable dans les tissus de soja 40-3-2 (Rogan et al., 1999).

2.5 Performance agronomique

Bien que cette remarque ne soit pas liée à un risque pour l'environnement ou la santé, le CS du HCB note que certains articles mentionnent une dépression de rendement du soja 40-3-2 (Benbrook, 1999; Elmore et al., 2001b; King et al., 2001).

D'autres articles mentionnent que, si certaines formulations de glyphosate peuvent affecter et réduire la nodulation de ces variétés tolérantes au glyphosate dans un premier temps, les plantes récupèrent de ce stress sans conséquences sur le rendement (Elmore et al., 2001a; Reddy and Zablotowicz, 2003).

Par ailleurs, des difficultés d'absorption de manganèse ont été suggérées chez des variétés de soja tolérantes au glyphosate, avec une compensation possible par une supplémentation

¹⁷ ORF (*Open Reading Frame*) : cadre ouvert de lecture, détecté par des programmes informatiques, correspondant à une séquence d'ADN qui peut coder, si elle est préalablement transcrite, une protéine ou un peptide (petite protéine). A la suite de la détection informatique d'un ORF, des analyses supplémentaires sont normalement réalisées pour tester s'il est effectivement transcrit en ARN et traduit en protéine ou en peptide.

¹⁸ Introgession : introduction d'un caractère dans une variété par croisement.

en manganèse (Gordon, 2007), mais cette observation semblait être dépendante non seulement du fond génétique des variétés comparées, mais également des conditions environnementales de culture (Gordon, 2008; Loecker et al., 2010), pouvant jusqu'à inverser le sens des différences observées (sur un des sites d'expérimentation, c'est la lignée isogénique non transgénique de soja, et non le soja GM, qui répond au manganèse, avec comme conséquence une augmentation de rendement) (Loecker et al., 2010). Il n'est donc pas possible de conclure que la tolérance au glyphosate en elle-même affecte l'absorption du manganèse.

Le dossier du pétitionnaire rapporte que des essais en champ et des études sur des cultures post-commercialisation (Delannay et al., 1995) ne mettent en évidence aucune différence agronomique ou phénotypique autre que le caractère de tolérance au glyphosate du soja 40-3-2 comparé à des variétés traditionnelles de soja (section D.4 du dossier technique).

Le CS du HCB aurait souhaité que ces données contradictoires de performance agronomique soient discutées par le pétitionnaire dans le dossier. S'il est envisageable qu'une dépression relative de rendement soit liée au fond génétique des variétés réceptrices de l'événement 40-3-2, dont le degré d'amélioration génétique peut être en retard par rapport aux dernières variétés de soja conventionnelles, il semble que le pétitionnaire lui-même reconnaisse l'existence d'un problème de rendement associé à l'événement 40-3-2, puisqu'il utilise l'argument d'un meilleur rendement pour justifier le développement d'un soja Roundup Ready de deuxième génération (Roundup Ready 2 Yield).

3. Evaluation des risques pour la santé humaine et animale

Bien que le dossier EFSA-GMO-NL-2005-24 ne concerne qu'une demande d'autorisation de culture du soja génétiquement modifié 40-3-2, il inclut une évaluation des risques pour la santé humaine et animale. Cette partie est semblable à la partie correspondante du dossier EFSA-GMO-RX-40-3-2, déposé par la société Monsanto pour une demande de renouvellement d'autorisation de mise sur le marché de ce soja pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale. L'analyse du CS du HCB reprend donc celle réalisée dans l'avis du 23 décembre 2010 sur ce précédent dossier (HCB, 2011), avec des remarques supplémentaires sur la prise en compte de résidus éventuels de glyphosate dans le soja 40-3-2, et sur l'adéquation entre les analyses statistiques mises en œuvre et les conclusions du pétitionnaire. Il est par ailleurs rappelé que l'Anses¹⁹ (Afssa²⁰ à l'époque), dans son avis du 10 juin 2008 sur le dossier EFSA-GMO-RX-40-3-2, avait estimé que les variétés de soja portant l'événement de transformation 40-3-2 et leurs produits dérivés présentaient le même niveau de sécurité sanitaire pour l'homme et l'animal que les variétés de soja conventionnelles et leurs produits dérivés (Afssa, 2008). Dans un contexte de culture, ces analyses permettent d'évaluer les risques associés à une consommation fortuite de soja 40-3-2.

3.1 Evaluation de la toxicité et de l'allergénicité de la protéine CP4 EPSPS

L'innocuité de la protéine CP4 EPSPS a été établie compte tenu de l'historique de son usage, et notamment de :

- l'innocuité pour les mammifères de la bactérie donneuse du gène (souche CP4 d'*Agrobacterium*)
- la similarité de la protéine CP4 EPSPS exprimée par le soja 40-3-2 avec les protéines EPSPS ubiquistes présentes dans les algues, les plantes à usage alimentaire et les

¹⁹ Anses : Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

²⁰ L'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) a fusionné avec l'Afssset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) le 1er juillet 2010 pour devenir l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).

micro-organismes tels que les levures et les bactéries, dont la consommation n'a pas révélé de conséquences délétères pour la santé

- l'absence d'homologie structurale (analyse bioinformatique des séquences d'acides aminés) des protéines CP4 EPSPS avec des toxines connues ou des protéines possédant une activité pharmacologique, répertoriées dans les bases de données (Allpeptides, Toxin5)
- l'absence d'effets négatifs détectés dans le test de toxicité orale aiguë
- le poids de l'évidence en faveur d'une absence d'allergénicité.

La toxicité orale aiguë de CP4 EPSPS a été évaluée chez la souris en utilisant une protéine CP4 EPSPS microbienne exprimée par une souche d'*E. Coli*, dont l'équivalence avec la protéine CP4 EPSPS exprimée par le soja 40-3-2 a été démontrée sur la base des propriétés physicochimiques et fonctionnelles suivantes :

- Identité du poids moléculaire, les valeurs estimées en SDS-PAGE et d'après la séquence codante apparaissant concordantes (respectivement \approx 44 kDa et 47,6 kDa)
- Immuno-réactivité équivalente (immoblots / SDS PAGE)
- Homologie de séquence (spectrométrie de masse / Maldi-Tof)
- Identité de la séquence amino-terminale de la protéine CP4 EPSPS du soja 40-3-2 avec celle de la séquence codante du gène *cp4 epsps*
- Absence de glycosylation
- Activité phosphatasique équivalente (respectivement 5,7 U/mg et 4,8 U/mg pour les protéines CP4 EPSPS du soja 40-3-2 et d'*E. Coli*).

Dans cette étude BPL²¹, des lots de 10 souris CD-1, mâles et femelles, ont été gavés de 49, 154 ou 572 mg/kg pc²², de protéine CP4 EPSPS²³²⁴, ou de 363 mg de BSA /kg pc ou de tampon. Aucun cas de mortalité, ni d'effet sur la consommation de nourriture, le poids corporel, ni de lésions macroscopiques en lien avec le traitement n'ont été observés (Harrison et al., 1996; Naylor, 1993).

En conclusion, aucun effet néfaste de la protéine CP4 EPSPS n'a été observé à la plus forte dose testée (NOAEL²⁵ = 572 mg/kg pc) après administration orale unique chez la souris CD-1.

L'évaluation du potentiel allergisant a été menée selon une approche fondée sur le poids de l'évidence prenant en compte les résultats des différents éléments suivants :

- Aucun cas d'allergie connu à ce jour attribuable à l'organisme source (*Agrobacterium* st CP4) et aux protéines qu'il produit
- Absence d'homologie de séquence en acides aminés de la protéine CP4 EPSPS avec les allergènes, les toxines et les protéines pharmacologiquement actives répertoriées dans les bases de données, et absence de séquence commune d'au moins 8 acides aminés contigus de la protéine CP4 EPSPS avec les allergènes connus (McCoy and Silvanovich, 2003)
- Dégradation rapide de la protéine CP4 EPSPS en milieu simulant l'estomac confirmée par la disparition de l'activité enzymatique (Leach, 2002).

²¹ Etude BPL : étude respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

²² kg pc: kilogramme de poids corporel.

²³ CP4 EPSPS exprimée par lignée *E. coli* GBIOO, portant le plasmide pMON21104.

²⁴ Doses sélectionnées selon deux critères : (1) scénario du pire cas supposant que 100% de tous les denrées alimentaires (soja, pomme de terre, tomate de produits céréaliers) contiennent la protéine CP4 EPSPS (0,1 % de la teneur totale en protéines ; (2) un facteur sécurité de 1000.

²⁵ NOAEL : *No observed adverse effect level*, la dose la plus élevée d'une substance pour laquelle aucun effet toxique n'est observé.

3.2 Evaluation de la toxicité orale subaiguë et de l'allergénicité du soja 40-3-2

Quatre études de tolérance du soja 40-3-2 ont été menées, deux études de 4 semaines et une étude de 13 semaines chez le rat, et une étude de 15 semaines chez le rat et la souris.

Les études de tolérance menées sur 4 semaines chez des rats SD²⁶ (10 par sexe) consommant des régimes renfermant 5 ou 10 % de farine dans la première étude, ou 24,8 % de tourteaux de soja 40-3-2 dans la deuxième étude, n'ont pas mis en évidence d'effets cliniques, ni d'altérations de la consommation alimentaire, de la croissance pondérale ou du poids des organes (Hammond et al., 1996; Naylor, 1993).

L'étude de tolérance menée sur 13 semaines chez des rats SD (5 par sexe) consommant des régimes renfermant 30, 60 ou 90 % de soja 40-3-2 n'a pas mis en évidence d'effets cliniques, d'altérations de la consommation alimentaire, de la croissance pondérale ou du poids des organes, ni d'anomalies histologiques des principaux organes (Zhu et al., 2004).

L'étude de tolérance menée sur 15 semaines chez des lots de rats BN²⁷ et de souris BA10²⁸ (10 par sexe) consommant des régimes renfermant 30 % de soja 40-3-2 cuit²⁹ n'a pas mis en évidence d'effets cliniques, d'altérations de la consommation alimentaire, de la croissance pondérale, du poids du foie et de la rate, ni d'anomalies histologiques des principaux organes lymphoïdes, indiquant l'absence de potentiel allergène de ce soja (Teshima et al., 2000). Le CS du HCB note toutefois que les méthodes statistiques utilisées dans cette étude ne sont pas décrites dans le dossier du pétitionnaire.

3.3 Etude d'alimentarité du soja 40-3-2

Quatre études d'alimentarité sur le soja 40-3-2 et un soja quasi-isogénique non transgénique ont été menées : une étude de 6 semaines chez le poulet, une étude de 4 semaines chez la vache laitière, une étude de 4 semaines chez le porc, et une étude de 10 semaines chez le poisson chat.

L'étude d'alimentarité menée sur 6 semaines sur 360 poulets (12 réplicats/sexe) consommant des régimes renfermant 27 – 32 % de soja 40-3-2 ou de soja témoin isogénique A5403 n'a pas mis en évidence d'effet sur la croissance pondérale des animaux, ni sur l'efficacité alimentaire (Hammond et al., 1996).

L'étude d'alimentarité menée sur 4 semaines sur 36 vaches laitières (2 réplicats) consommant des régimes renfermant 10 % de soja 40-3-2 ou de soja témoin A5403 n'a pas mis en évidence d'effet sur la consommation alimentaire, la digestibilité de la matière sèche et la balance azotée et la production de lait et sa composition (Hammond et al., 1996).

L'étude d'alimentarité menée sur 100 porcs (10 réplicats) consommant des régimes renfermant du soja Roundup Ready³⁰ ou du soja témoin quasi isogénique n'a pas mis en évidence d'effet sur la consommation alimentaire, le gain pondéral des animaux, les paramètres de carcasse et la composition de la viande et sa valeur gustative (Cromwell et al., 2002).

L'étude d'alimentarité menée sur 15 semaines sur le poisson chat (5 réplicats) consommant de la nourriture renfermant 45 – 47 % de tourteau de soja 40-3-2 ou de soja témoin A5403 n'a pas mis en évidence d'effet sur la croissance pondérale, ni sur l'efficacité alimentaire et la teneur en protéines et en graisses des filets (Hammond et al., 1996).

²⁶ Lignée SD : lignée Sprague Dawley.

²⁷ La lignée de rats BN (Brown Norway), particulièrement sensible aux réactions allergiques, est communément utilisée dans les études d'allergénicité.

²⁸ La lignée de souris BA10, sensible à l'ovalbumine et à divers antigènes, est communément utilisée dans les études d'immunotoxicité.

²⁹ Chauffage à 100 °C pendant 30 minutes pour éliminer les facteurs antitrypsiques.

³⁰ Cultivar H4994RR exprimant la protéine CP4 EPSPS et traité avec du glyphosate.

3.4 Remarques sur la prise en compte du traitement herbicide au glyphosate

A une exception près, les analyses comparatives effectuées dans le cadre de l'évaluation de la toxicité et de l'alimentarité du soja 40-3-2 ne prennent pas en compte – ou du moins n'indiquent pas prendre en compte – la possibilité que le soja 40-3-2 soit traité par un herbicide à base de glyphosate durant sa culture, et que le produit en résultant puisse en contenir des résidus.

En effet, le dossier ne donne aucune indication du moindre traitement du soja 40-3-2 par le glyphosate pour les deux études de toxicité de 28 jours sur le rat (Hammond et al., 1996; Naylor, 1993), pour les deux études de toxicité de 13 semaines sur le rat (Teshima et al., 2000; Zhu et al., 2004), ni dans l'étude d'équivalence nutritionnelle sur poulet (Hammond et al., 1996), les études sur vache laitière (Hammond et al., 1996) et sur le poisson chat (Hammond et al., 1996). Seule l'étude d'alimentarité sur le porc (Cromwell et al., 2002) inclut un échantillon de soja 40-3-2 traité avec un herbicide à base de glyphosate (le Roundup®) :

“Two sources of dehulled soybean meal from either genetically modified soybeans or from near-isogenic conventional soybeans were evaluated in this study. (...) Both soybeans were grown in the yr 2000 under similar agronomic conditions, except that the Roundup Ready soybeans were sprayed with Roundup.” (Cromwell et al., 2002).

Le document d'orientation de l'AESA sur l'évaluation des risques relatifs aux aliments consistant ou provenant en partie de plantes GM recommande que, pour l'évaluation des plantes GM tolérantes aux herbicides, une analyse comparative mette en jeu trois comparateurs : les plantes GM exposées à l'herbicide auquel elles sont tolérantes, leur comparateur, soumis à un régime conventionnel d'herbicide, et les plantes GM soumises à ce même régime conventionnel (EFSA, 2011). Le CS du HCB demande que le traitement herbicide au glyphosate soit pris en compte dans l'évaluation des impacts sanitaires du soja 40-3-2 conformément à ces recommandations de l'AESA (EFSA, 2011).

Le CS du HCB note que la substance active glyphosate est inscrite à l'annexe I de la Directive 91/414/CEE³¹ (EEC, 1991). Cela signifie que, dans le cadre de son évaluation européenne, le glyphosate a fait l'objet d'une évaluation favorable des risques pour l'homme et l'environnement, notamment des risques pour l'opérateur et pour le consommateur (fondée sur des études fournies conformément aux exigences figurant à l'Annexe II de la Directive 91/414/CEE) (voir section 4.4).

3.5 Considérations sur les analyses statistiques

Seuls des tests individuels de comparaison sont mis en œuvre. Le pétitionnaire conclut pourtant à l'équivalence en substance, l'équivalence compositionnelle et nutritionnelle du soja 40-3-2 avec ses comparateurs non génétiquement modifiés. Ces conclusions nécessitent la mise en œuvre d'études de puissance et de tests d'équivalence. Les recommandations de l'AESA allant dans ce sens pour les analyses de composition (EFSA, 2010) devront être suivies à l'avenir.

³¹ Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, mise en application en 1993, et abrogée par le Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 entré en vigueur le 14 juin 2011. L'objectif de ce règlement est d'établir des règles uniformes concernant les conditions et procédures d'autorisation des produits phytopharmaceutiques dans l'Union européenne. Seuls sont autorisés les produits phytopharmaceutiques dont les substances actives figurent sur la liste de l'annexe I de la directive et qui ne présentent pas de risque pour la santé humaine ou animale, ni pour l'environnement lorsque le produit est utilisé dans des conditions normales. La directive a été transposée en droit français par le décret n° 94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques, assorti de plusieurs arrêtés d'application. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31991L0414:FR:HTML>.

4. Evaluation des risques pour l'environnement

Les risques pour l'environnement potentiellement associés à la culture du soja 40-3-2 sont *a priori* de deux natures différentes : d'une part, un risque de dissémination du transgène et ses conséquences, et d'autre part, un risque indirect, associé à l'utilisation possible d'herbicides à base de glyphosate dans l'itinéraire de culture du soja 40-3-2.

Le risque de dissémination du transgène peut provenir d'une dispersion de graines, d'une dispersion de pollen, ou d'un transfert d'ADN vers des bactéries. En cas de dissémination, il est important de noter que le caractère introduit ne confère aucun avantage compétitif en l'absence de traitement aux herbicides à base de glyphosate. Cette dissémination ne constituerait donc pas un risque pour l'environnement au sens strict, mais plutôt un point à considérer dans le cadre de la coexistence entre les filières GM et non GM.

4.1 Dissémination potentielle du transgène par les graines

Les disséminations de graines peuvent avoir lieu dans la parcelle cultivée de soja au moment du semis ou de la récolte, ou lors des transports et manutention jusqu'au tritrateur.

- Dissémination de graines au semis :

Le semis du soja est effectué en général avec des semoirs de précision disposant de systèmes de vidange. La taille de la graine (pmg³² d'environ 140 à 160 g) limite les risques de mauvaise vidange, ou de rétention de graines dans le semoir.

- Qualité germinative des graines :

La qualité germinative des graines est de longue date un point faible des légumineuses d'une façon générale et du soja en particulier. En France, dans les années 80, les germinations de semences, pourtant certifiées, s'averraient souvent défectueuses au niveau du champ. La qualité germinative dépend des conditions de culture initiale, d'éventuelles piqûres d'insectes, comme les punaises, qui peuvent transmettre le virus de la mosaïque du soja qui affecte la germination, puis des conditions de conservation (humidité, variation de température). Lorsqu'il s'agit de graines issues de transport en bateau, de durée assez longue, les graines subissent des variations de température et d'hygrométrie défavorables. Ainsi, les conditions de maintien de la faculté germinative sont rarement remplies.

Pour germer, les graines de soja ont des exigences thermiques importantes. L'optimum de germination se situe aux alentours de 30°C (Planchon, 1986). Il n'y a pas de germination pour des températures inférieures à 10°C, qui constitue une température minimale (Matthews and Hayes, 1982; Unander et al., 1983).

On notera l'absence de phénomène de dormance pour les graines de soja, qui germent dès que les conditions d'humidité et de température sont satisfaites.

- Sensibilité au froid :

Le soja fait partie des espèces d'origine tropicale sensibles au froid. Le zéro de végétation, considéré le plus fréquemment par les agronomes pour décrire la croissance et le développement du soja sur une échelle thermique, est 6°C. Pour le modèle de croissance et de développement SOYGRO, des seuils thermiques de 5 à 7°C sont pris comme seuils minimaux (Brisson, 1989; Brisson et al., 1989). Ces données générales cachent une variabilité génétique qui peut permettre de rechercher et sélectionner des génotypes plus tolérants aux basses températures (12-15°C) (Gass et al., 1996) pour les groupes de précocité septentrionaux (0, 00 et 000). Cependant, les possibilités restent limitées (Planchon, 1986). Les optima de croissance se situent bien au-dessus de ces températures. Le

³² Pmg : poids de mille graines.

pétitionnaire cite à juste titre un intervalle de 25 à 35°C. Certains travaux montrent des dommages importants au niveau des protéines du système photosynthétique dès l'application de stress courts à moins de 7°C (Tambussi et al., 2004).

Des agronomes américains considèrent que le soja est plus sensible que le maïs aux coups de froid pouvant survenir en mai. Dès qu'il y a décoloration de l'hypocotyle après l'émergence, il y a ensuite mort de la plante (Source Purdue University Cooperative Extension Service Etats-Unis). Le pétitionnaire cite la référence <http://www.ag.ndsu.edu/disaster/winterstorm/frostsoybeans.html>, très explicite sur ce point. Les conditions météorologiques du mois de mai 2010 aux Etats Unis ont bien illustré la grande sensibilité au froid du soja aux stades végétatifs. Dès des températures inférieures à 15°C, de nombreuses fonctions physiologiques sont affectées et se traduisent par des ralentissements importants de croissance et des accidents de nouaison (CETIOM 1986).

- Nutrition azotée :

Les graines tombées au sol pourraient germer si les conditions de température et de sols sont optimales, mais en absence d'inoculum de la bactérie *Bradyrhizobium japonicum* (assurant la fixation de l'azote atmosphérique), les germinations seront souffreteuses. Ces germinations ne pourront pas s'installer car le soja demande des conditions de température optimales pour pousser (25-35°C) et ne supporte pas les froids hivernaux. De plus, ces repousses seront faciles à éliminer par divers moyens mécaniques.

- Risque d'égrainage avant ou pendant la récolte :

Avant ou pendant la récolte des graines produites peuvent tomber au sol et contribuer à une dissémination. Avant la récolte, et selon les conditions de climat et d'irrigation, certaines variétés avaient montré dans les années 80 des risques d'ouverture par éclatement des gousses. Cela a abouti au retrait du marché de ces variétés compte tenu des pénalités engendrées pour les agriculteurs.

4.2 Dissémination potentielle du transgène par le pollen vers d'autres plantes (Transfert de gène vertical)

- Dissémination potentielle du transgène par le pollen vers d'autres espèces :

Le croisement entre les variétés de soja cultivé [*Glycine max* (L.) Merr] et les espèces sauvages voisines (*Glycine soja*) est possible dans le centre d'origine du soja (Provinces du nord et du nord-est de la Chine et des régions adjacentes de la Russie ainsi qu'en Corée et au Japon), où ces espèces sauvages sont naturellement présentes. Le risque d'un tel croisement est nul en Europe en l'absence des espèces sauvages concernées. On notera que l'espèce appelée en langage commun « Glycine » est en fait un genre éloigné taxonomiquement du soja : *Wisteria*. En Guyane, où le CETIOM, en partenariat avec la chambre d'agriculture locale, et en collaboration avec l'EMBRAPA brésilien (centre de recherche agronomique Brésilien), réalise des expérimentations pour tenter d'introduire la culture du soja non génétiquement modifié pour la production d'aliments pour bétail, la présence de plantes sauvages apparentées et voisines du soja (*Glycine max*) n'est pas signalée à ce jour.

- Dissémination potentielle du transgène par le pollen de champ de soja à champ de soja :

La fleur de soja se caractérise par une réceptivité du stigmate qui intervient avant l'ouverture de la fleur. Cette réceptivité est assez courte, de 24h avant l'anthèse à 48h après. Le pollen

est lui aussi viable sur des durées courtes de 2 à 4h. Ainsi, ces propriétés, et la cléistogamie³³ de la fleur, assurent un taux d'autogamie très élevé, proche des 100 %. Ces propriétés constituent d'ailleurs des difficultés importantes pour les sélectionneurs qui cherchent à croiser des ressources génétiques. Un technicien très expérimenté en conditions optimales en serre ne réussit que 5 à 20 % des croisements qu'il tente.

Le dossier reprend des références du CETIOM des années 80, pour ensuite souligner les risques d'avortement importants après fécondation, en particulier au champ lorsqu'il y a des variations importantes de température entre jour et nuit ou suite à un stress abiotique, température ou stress hydrique.

Le dossier du pétitionnaire reprend les données disponibles dans la littérature sur les niveaux de pollinisation croisée. L'ensemble des travaux mentionnés est cohérent. Les taux d'allogamie sont très faibles. Ils varient de 0 à 2,4 % pour des distances à la source de pollen de moins d'un mètre, légèrement plus en présence d'insectes pollinisateurs spécifiquement rajoutés. Au-delà, les valeurs sont encore plus faibles. Les pétitionnaires citent à bon escient l'une des évaluations les plus récentes sur ce sujet, revisitée entre 2001 et 2003 par l'USDA, avec l'utilisation de génotypes à fleurs blanches en récepteurs, et des génotypes à fleurs violettes comme sources de pollen, cette teinte étant un caractère dominant facilement identifiable à la génération suivante (Ray et al., 2003). Une étude brésilienne récente non citée dans le dossier (Abud et al., 2007), réalisée au champ, confirme les données précédentes, avec un taux moyen d'allogamie sur le rang voisin de 0,52 %, 0,12 % sur le rang suivant et un taux de 0,0179 % (représentant 18 plantes sur 100,000) à 10 mètres de la source.

Cependant, l'ensemble des études provient principalement du continent américain, et aucune n'a pris soin de quantifier la faune pollinisatrice présente, ni les caractéristiques intrinsèques des variétés considérées, le taux d'autogamie dépendant du niveau de cléistogamie de la variété (Ortiz-Perez et al., 2006a). Par ailleurs, les fleurs de soja produisent du nectar (Erickson and Garment, 1979), et elles sont effectivement visitées par les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) dans le monde entier [Brésil (Chiari et al., 2005), Chine (Chiang and Kiang, 1987), Etats-Unis (Abrams et al., 1978; Erickson et al., 1978; Mason, 1979)]. Il existe aussi une faune d'abeilles sauvages abondante et diversifiée qui visite les fleurs de soja (Rust et al., 1980). En particulier, la mégachile *Megachile rotundata*, une espèce abondante dans le sud de la France et originaire d'Europe du sud, est un pollinisateur efficace du soja (Ortiz-Perez et al., 2006b; Roumet and Magnier, 1993), tout comme l'abeille domestique (Koelling et al., 1981). Dans ces conditions, le fait que les taux d'allogamie mesurés au champ au Brésil (Abud et al., 2007) et aux Etats-Unis (Ray et al., 2003) soient très faibles, ne constitue pas une garantie que ces taux se retrouvent en France. Il est probable que ces taux varient, ainsi que la distance de dispersion du pollen, en fonction de la faune pollinisatrice présente dans la zone de culture.

Il n'y a donc en fait que très peu d'éléments de réponse objectifs et chiffrés. On peut penser que les systèmes de culture et les paysages européens, et en particulier ceux concernés par la culture du soja, sont globalement plus favorables à des populations d'insectes plus complexes et diversifiées que ne le sont les grandes plaines à très grandes parcelles du Middle-West américain et du Mato-Grosso brésilien.

- Dissémination potentielle du transgène à partir de pollen de repousses transgéniques dans les champs de soja :

Du fait de l'absence de dormance chez le soja, les graines tombées au sol germent dès que les conditions d'humidité et de température sont satisfaites (30°C pour des conditions optimales, mais germination possible dès 10°C). L'espèce ne supportant pas le froid, les repousses apparues avant l'hiver ne survivront pas aux conditions hivernales que l'on trouve communément en Europe, et ne contamineront pas les cultures suivantes. Cette affirmation devra être révisée dans un contexte de réchauffement climatique. De plus, elle ne s'applique pas à certains des DOM-COM français situés en conditions tropicales, pour lesquels des

³³ Se dit d'une fleur qui reste fermée au moment de l'anthesis et dont la pollinisation ne peut donc se faire que par autopolinisation.

mesures appropriées devront être mises en place pour contrôler les repousses de soja dans le cadre de la coexistence si des cultures de soja GM et non GM s'y développaient.

4.3 Dissémination potentielle du transgène vers les bactéries du sol (Transfert de gène horizontal)

La possibilité de transfert de gènes entre plantes transgéniques et bactéries de l'environnement a été démontrée au laboratoire sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices, principalement *Acinetobacter baylyi* (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008).

Les premiers travaux en conditions simulant l'environnement (Kay et al., 2002) montrent qu'une plante soumise à une attaque par un pathogène devient colonisable par d'autres bactéries, y compris par des microorganismes capables de développer un stade de compétence et d'acquérir les gènes de la plante. La plante en décomposition (résidusphère) constitue également un écosystème extrêmement favorable à l'acquisition de gènes de la plante génétiquement modifiée par les bactéries du sol qui le colonisent (Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Comme dans le cas de la plante infectée par un pathogène, la décomposition du matériel végétal contribue à la libération de l'ADN au contact de bactéries métaboliquement très actives du fait de la disponibilité de nutriments, ce qui leur permet de développer un stade de compétence pour l'acquisition de gènes de plante par transfert horizontal. Il est toutefois important de rappeler que de tels événements de transfert de gène entre bactéries et plantes n'ont jamais été observés au champ (Demanèche et al., 2008).

La possibilité de transfert de l'ADN du transgène est liée à la présence de séquences procaryotiques, qui peuvent être intégrées par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens à des fréquences significatives, donc détectables. Signalons qu'en théorie, les autres séquences typiquement végétales des génomes des plantes génétiquement modifiées pourraient également être intégrées dans les génomes bactériens par recombinaison illégitime, mais à des fréquences extrêmement faibles. De plus, de telles séquences constituent un fardeau génétique pour la bactérie – puisque ne pouvant s'y exprimer –, et ne sont donc pas fixées dans ces génomes, comme le montre l'analyse des séquences des génomes bactériens dans lesquelles très peu de séquences d'origine végétale sont détectées.

Pour évaluer les potentialités de transfert de séquences transgéniques de la plante génétiquement modifiée considérée aux bactéries de l'environnement, il convient donc en premier lieu de rappeler la structure de la cassette transgénique, et l'origine des gènes et des séquences qui la composent. Le soja génétiquement modifié 40-3-2 exprime l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, de la souche CP4 d'*Agrobacterium* (CP4 EPSPS), qui lui confère la tolérance au glyphosate. Dans le cas de cette cassette transgénique, les séquences entrant dans la catégorie des régions d'ADN pouvant être transférées à des fréquences plus élevées que les autres gènes de la plante car d'origine procaryotique sont donc limitées aux séquences provenant d'*Agrobacterium*, c'est-à-dire au gène codant l'enzyme CP4 EPSPS. Les transgènes d'origine bactérienne sont souvent optimisés pour leur expression dans les plantes, optimisation qui a pour conséquence que la nouvelle séquence ne s'exprimerait plus si elle se retrouvait dans une bactérie. Dans le cas du soja 40-3-2, à part la fusion de ce gène à une séquence amino-terminale d'adressage au chloroplaste provenant d'un gène de pétunia, aucune information n'indique que la séquence originale d'*Agrobacterium* a été modifiée (Padgett et al., 1995), ce qui théoriquement rendrait possible son expression dans une bactérie après transfert horizontal.

Il est par ailleurs possible qu'un transfert d'ADN réalisé par amorçage de la recombinaison sur les régions de totale similarité entre ADN donneur (le transgène) et génome récepteur (le génome bactérien), comme ce pourrait être le cas avec le gène *cp4 epsps*, aboutisse au co-transfert des régions adjacentes, comprenant les autres séquences du transgène et celles du chromosome de la plante, situées au voisinage des sites d'intégration du transgène. De tels événements ont été détectés à des fréquences très faibles dans le cadre d'études en

conditions optimisées de laboratoire sur un autre couple modèle plante transgénique-bactérie réceptrice par Gebhard et Smalla (1998).

Il reste à évaluer si le transfert horizontal du transgène *cp4 epsps* du soja 40-3-2 aurait un impact sur la microflore du sol. Intuitivement, on pourrait penser qu'en présence de glyphosate, des bactéries sensibles pourraient être avantagées par l'acquisition d'un allèle leur conférant une tolérance au glyphosate.

La bactérie source du transgène, *Agrobacterium*, est une bactérie commune du sol ; le gène codant l'enzyme EPSPS est donc déjà largement répandu au sein de la microflore du sol. La fréquence de l'allèle de la souche CP4 d'*Agrobacterium* codant l'enzyme CP4 EPSPS tolérante au glyphosate est toutefois inconnue. Mais si la fréquence de cet allèle particulier est inconnue, il a été montré que de nombreuses autres bactéries du sol sont tolérantes au glyphosate, certaines l'utilisant même comme source d'énergie et de nutriments (Kuklinsky-Sobral et al., 2005). Les bactéries du sol sensibles au glyphosate pourraient donc acquérir le caractère de résistance par simple transfert à partir de ces bactéries résistantes (dont la souche CP4 d'*Agrobacterium*) avec une plus forte probabilité qu'à partir de la plante de soja 40-3-2.

La question du transfert à partir du soja 40-3-2 se pose toutefois plus particulièrement pour le symbiote fixateur d'azote *Bradyrhizobium japonicum*, qui se développe au sein des nodosités racinaires du soja, et qui est naturellement sensible au glyphosate [démonstration en laboratoire (Wagner et al., 2008)]. Cependant, cette bactérie n'étant pas naturellement transformable génétiquement³⁴ (Paget and Simonet, 1994), la probabilité d'un transfert de gène horizontal à partir de la plante est extrêmement faible. D'autre part, il a été montré expérimentalement en laboratoire que le gène *cp4 epsps* n'était pas capable d'expression chez *B. japonicum* (Arango Isaza, 2009). Ainsi, même si un tel événement de transfert venait à se réaliser naturellement au champ, l'absence d'expression du gène *cp4 epsps* dans *B. japonicum* permet d'exclure toute modification de la valeur adaptative, y compris sous pression de sélection forte liée à la présence de l'herbicide (Arango Isaza, 2009). Ce même auteur rapporte par ailleurs que le taux de mutation naturelle affectant le gène *epsps* de *B. japonicum* est très élevé, lui permettant d'acquérir rapidement une tolérance au glyphosate par mutation. Ce résultat peut expliquer les résultats observés au champ sur l'absence d'impact d'un traitement au glyphosate sur les propriétés de nodulation alors que la bactérie montre en culture pure une sensibilité conséquente à cet herbicide. Cette observation peut également être liée à la présence de champignons mycorrhiziens arbusculaires (voir section 4.4).

Le transfert d'une ou même plusieurs copies de ce gène dans le génome des bactéries telluriques ne changerait donc pas la structure, tant taxonomique que fonctionnelle, de la communauté bactérienne.

4.4 Evaluation des risques associés à l'utilisation de glyphosate dans l'itinéraire de culture du soja 40-3-2

Il est rappelé ici que l'instance chargée de l'évaluation des produits phytopharmaceutiques en France est l'Anses (Direction des Produits Réglementés). L'Anses évaluera notamment les risques pour l'homme et l'environnement de l'utilisation d'une préparation à base de glyphosate appliquée sur le soja 40-3-2, quand elle sera saisie d'une demande d'avis relative à une demande d'autorisation de mise sur le marché en France d'une telle préparation à des fins de désherbage de variétés de soja *cp4 epsps*.

A ce jour, aucun avis de l'Anses sur le sujet n'a encore été publié ; aucune formulation herbicide à base de glyphosate n'est autorisée sur le soja *cp4 epsps* en France³⁵.

³⁴ La transformation bactérienne correspond au transfert d'un gène dans une bactérie.

³⁵ Vérification le 25 juillet 2011 de la base de données e-phy (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>) du MAAP, catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France.

Toutefois, le glyphosate figure sur la liste des substances actives inscrites à l'annexe I de la Directive 91/414/CEE³⁶⁷ (EEC, 1991) depuis le 7 janvier 2002 [Directive d'inscription 2001/99/CE³⁸ (EC, 2001)]. Cela signifie que, suite à une évaluation européenne favorable, le glyphosate peut être utilisé dans des préparations dont l'autorisation de mise sur le marché sera conditionnée par une évaluation au niveau des Etats membres pour un usage spécifique.

Ainsi, une préparation destinée au désherbage des variétés de soja portant l'événement de transformation 40-3-2 ne pourra être autorisée qu'après évaluation notamment des risques pour l'opérateur, le consommateur et les organismes de l'environnement (propriétés physico-chimiques et toxicologiques de la préparation, données d'exposition de l'opérateur, des personnes présentes et des travailleurs, données relatives aux résidus et à l'exposition du consommateur, données relatives au devenir et au comportement dans l'environnement de la préparation, données d'écotoxicité, données biologiques sur l'effet du produit sur les plantes traitées, les cultures adjacentes et suivantes) ainsi que de son efficacité et sa phytotoxicité pour le soja.

Plus précisément, l'évaluation des risques pour le consommateur sera fondée sur l'analyse des essais résidus³⁹ réalisés sur des variétés de soja portant l'événement de transformation 40-3-2 et mesurés dans la plante traitée avec du glyphosate selon des bonnes pratiques agricoles critiques définies et leur conformité à la limite maximale de résidus (LMR) fixée au niveau européen⁴⁰. Le niveau d'exposition des différents groupes de consommateurs européens sera estimé en utilisant le modèle PRIMo Rev 2-0 (Pesticide Residue Intake Model) développé par l'AESA. Au regard des données relatives aux résidus évaluées dans le cadre du dossier, les risques pour le consommateur seront considérés comme acceptables ou non en comparaison avec la dose journalière admissible.

Sans préjuger des conclusions de l'avis de l'Anses en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché d'une préparation à base de glyphosate, le CS du HCB note les points suivants à partir de son analyse des données fournies par le pétitionnaire dans le présent dossier de demande d'autorisation de culture du soja 40-3-2, et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique.

- Préconisations du pétitionnaire :

Le pétitionnaire précise dans le dossier qu'il n'est pas nécessaire d'introduire de techniques ou pratiques culturales particulières pour conduire la culture du soja 40-3-2. Les herbicides habituels sont toujours utilisables. Pour le pétitionnaire, la tolérance au glyphosate n'apporte qu'un outil de gestion supplémentaire, que l'agriculteur peut exploiter s'il le souhaite, en adaptant avantageusement, sur le soja 40-3-2, l'utilisation d'herbicides à base d'une substance active déjà connue et utilisée, le glyphosate. Partant de ce principe d'utilisation

³⁶ Directive 91/414/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, mise en application en 1993, et abrogée par le Règlement (CE) n° 1107/2009 adopté le 21 octobre 2009 et entré en vigueur le 14 juin 2011. L'objectif de la Directive 91/414/CEE est d'établir des règles uniformes concernant les conditions et procédures d'autorisation des produits phytopharmaceutiques dans l'Union européenne. Seuls sont autorisés les produits phytopharmaceutiques dont les substances actives figurent sur la liste de l'annexe I de la directive et qui ne présentent pas de risque pour la santé humaine ou animale, ni pour l'environnement lorsque le produit est utilisé dans des conditions normales. La directive a été transposée en droit français par le décret n° 94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques, assorti de plusieurs arrêtés d'application. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31991L0414:FR:HTML>.

³⁷ La liste des substances actives inscrites à l'annexe I de la directive 91/414/CEE est consultable en ligne sur le lien : http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.

³⁸ Directive 2001/99/CE de la Commission du 20 novembre 2001 modifiant l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques en vue d'y inscrire les substances actives glyphosate et thifensulfuron-méthyle. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0099:FR:HTML>.

³⁹ La définition du résidu est fixée au niveau européen selon le type de modification génétique et sur la base d'étude de métabolisme dans le soja génétiquement modifié.

⁴⁰ Une LMR de 20 mg/kg est fixée (Règlement (CE) n°839/2008). Toutefois, cette LMR est actuellement en cours de révision dans le cadre de l'article 12-2 du Règlement (CE) n°396/2005.

optionnelle du glyphosate, le pétitionnaire ne voit pas de pratiques particulières à évaluer concernant la conduite de culture du soja 40-3-2.

Au lieu de mettre en avant la promesse d'une meilleure gestion des adventices et, par voie de conséquence, d'un meilleur rendement grâce au traitement du soja 40-3-2 au glyphosate, le pétitionnaire met en avant les points suivants, associés à l'option de l'utilisation du glyphosate :

- Le glyphosate a un très large spectre d'activité sur les adventices : c'est l'herbicide total le plus efficace.
 - Il apporte un nouveau mode d'action en culture, sur des variétés tolérantes : en France par exemple, il n'y a que 13 molécules autorisées (six modes d'action) dont la plupart sont des herbicides de pré-levée et très peu d'herbicides de post-levée très efficaces, sauf pour les cinq strictement anti-graminées. Il est donc difficile de contrôler des dicotylédones adventices levées tardivement.
 - L'efficacité du glyphosate et de la tolérance au glyphosate permettent une plus grande flexibilité dans les dates de traitement : en effet, grâce à la grande efficacité du produit et à la sélectivité totale de la variété GM, il n'y a plus besoin de se préoccuper des stades des adventices et de la culture.
 - Un nombre réduit de traitements au glyphosate est suffisant, ce qui est susceptible de coûter moins cher que les traitements conventionnels.
 - Enfin, le point principal mis en avant est le fait que cet herbicide facilite l'adoption de systèmes de culture de semis direct avec des techniques culturales réduites voire sans aucun travail du sol : c'est en effet ce que l'on constate à travers le monde chez les agriculteurs qui utilisent ce type de cultures et c'est ce qui leur donne un avantage économique (moins de passages donc gain de temps et économie de carburants).
- Pratiques et conséquences associées à l'utilisation du glyphosate sur variétés de soja tolérantes au glyphosate :

Après plus de 15 ans de culture de variétés GM à travers le monde, la résistance au glyphosate est de loin le caractère transgénique le plus utilisé. Un certain nombre d'articles ont rapporté les conséquences sur l'environnement de la culture de ces plantes GM tolérantes au glyphosate [synthétisés par (van den Brink et al., 2010)]. La plupart des conséquences rapportées semblent résulter de l'usage particulier du glyphosate sur les plantes GM, plutôt que des plantes GM elles-mêmes, même si les deux composantes du système [glyphosate / plantes GM tolérantes au glyphosate] sont souvent indissociables.

Si l'évaluation de l'impact environnemental du glyphosate appliqué à des variétés de soja cp4 epsps sera effectuée par l'Anses, le HCB note d'ores et déjà les effets suivants, associés au système [glyphosate / variétés de soja tolérantes au glyphosate] :

1- Réduction du travail du sol

Les avantages apportés par l'usage du glyphosate en culture (flexibilité d'usage, très large spectre d'activité), par ses caractéristiques (très peu de mutations de cible conduisant à la résistance, absence quasi-totale de détoxication par les plantes, limitant la sélection de plantes qui détoxiquent) ont conduit la profession à encourager une stratégie du « tout glyphosate ».

Ceci a conduit, dans des pays aux sols qui s'y prêtaient (surtout aux Etats Unis, mais également en Argentine), à la réduction, voire à la suppression du travail du sol, puis, à l'extrême, à bâtir des successions de cultures GM sur ce principe : maïs – soja, parfois en alternance avec du coton. Ces systèmes de culture ont conduit à des parcelles non travaillées pendant de nombreuses années, dont la gestion des adventices, en culture comme en inter-culture, est exclusivement fondée sur des traitements répétés au glyphosate. Une telle stratégie conduit inéluctablement à la sélection de génotypes résistants (Powles, 2008) (voir section 2 suivante).

La réduction du travail du sol peut avoir des conséquences positives mais aussi occasionnellement négatives sur l'environnement, selon la région et le type de sol (van den Brink et al., 2010). Elle permet généralement un système de culture plus durable grâce à une réduction de l'érosion du sol, une amélioration des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, et une diminution des coûts économiques et environnementaux associés au labour (van den Brink et al., 2010). Elle peut avoir un impact favorable sur la biodiversité, non seulement du sol, mais également de la faune sauvage (van den Brink et al., 2010). Dans certaines conditions, une absence du travail du sol peut au contraire compacter le sol, favoriser le développement de pathogènes et de maladies passant l'hiver sur des résidus de culture, et accroître l'acidité des sols (van den Brink et al., 2010).

2- Sélection d'adventices tolérantes au glyphosate

Le CS du HCB précise en préalable que le risque de sélectionner des génotypes résistants à l'herbicide parmi les espèces adventices associées à la culture traitée est inhérent à toute utilisation d'herbicide. Ce risque peut être accru par de mauvaises pratiques agricoles rendues possibles par toute culture de plantes tolérantes à des herbicides. De plus, le risque de développement d'adventices résistants n'est pas un risque direct pour l'environnement, mais un risque de diminuer l'efficacité des herbicides pour les agriculteurs, qui devront faire appel à des pratiques alternatives de gestion des mauvaises herbes avec un impact potentiellement plus important sur l'environnement.

Depuis l'introduction de variétés GM tolérantes au glyphosate, l'évolution dans l'utilisation des herbicides et l'apparition des génotypes résistants d'adventices a été progressive : il y a eu, dans un premier temps, réduction du nombre de traitements par rapport aux herbicides sélectifs des variétés conventionnelles, mais aussi, à l'initiative des agriculteurs, réduction des doses de glyphosate. Cette réduction des doses a favorisé la sélection d'adventices difficiles à contrôler puis de génotypes résistants, ce qui a conduit, dans un premier temps, à un retour aux doses homologuées de glyphosate, puis, en plus du glyphosate, à la réintroduction d'herbicides sélectifs utilisés en variétés conventionnelles pour essayer d'enrayer l'apparition des résistants. Des génotypes résistants ont été sélectionnés (surtout aux Etats-Unis, Argentine et Brésil) dans plusieurs espèces : trois espèces d'amaranthes, deux espèces d'ambrosies, la vergerette du Canada, *Eleusine indica*, *Kochia scoparia*, *Euphorbia heterophylla*, *Sorghum halepense* et même le ray grass (Heap, 2011).

Une enquête aux Etats-Unis en 2006 sur les perceptions et expériences des agriculteurs avec la résistance au glyphosate a montré que plus de 30 % étaient déjà confrontés à l'apparition d'adventices résistants, après 5 ans de cultures GM (Foresman and Glasgow, 2008). Pour résoudre le problème posé par la résistance au glyphosate, 92 % étaient persuadés que les firmes leur proposeraient des solutions nouvelles et efficaces en 3 à 5 ans (Foresman and Glasgow, 2008).

A *contrario*, une enquête au Brésil dans l'état de Paraná (Fok et al., 2010) montre un type d'utilisation diversifiée, un exemple de bonnes pratiques agricoles, que l'on peut pratiquer avec des variétés GM résistantes au glyphosate : si environ 80 % des agriculteurs cultivent du soja résistant au glyphosate, la plupart cultivent à la fois des variétés conventionnelles et transgéniques sur l'exploitation, et même sur la même parcelle. En fait, ils utilisent le glyphosate comme facteur nettoyant des parcelles, ce qui leur permet d'alterner les deux types de variétés, les conventionnelles étant susceptibles d'avoir un meilleur rendement quand les parcelles sont propres (Fok et al., 2010). Des biotypes résistants au glyphosate se sont toutefois développés pour 6 espèces d'adventices en Amérique du Sud depuis l'introduction de plantes GM tolérantes au glyphosate (Heap, 2011).

3- Autres effets de l'utilisation du glyphosate sur variétés GM tolérantes :

En plus des conséquences prévisibles mentionnées ci-dessus, de réduction de travail du sol et de sélection de génotypes résistants d'adventices, des effets moins prévisibles ont été observés dans la culture des variétés de soja tolérantes au glyphosate (van den Brink et al., 2010).

Il a été rapporté que l'application de glyphosate peut affecter la nodulation et l'efficacité de la fixation d'azote dans les nodules de variétés de soja tolérantes au glyphosate (King et al., 2001; Kremer and Means, 2009). Cependant, s'il a été confirmé que certaines formulations de glyphosate peuvent affecter et réduire la nodulation de ces variétés dans un premier temps, il a été démontré que les plantes récupèrent de ce stress sans conséquences sur le rendement (Reddy and Zablutowicz, 2003). D'autres expériences montrent que, si le glyphosate peut légèrement affecter la symbiose entre soja et *Bradyrhizobium japonicum* selon la date d'application du traitement, cet effet négatif disparaît en condition de symbiose tripartite entre soja, *B. japonicum* et champignons mycorhiziens arbusculaires (*Glomus intraradices*) (Powell et al., 2009), condition qui reflète plus l'environnement de culture au champ.

L'application de glyphosate sur les plantes tolérantes au glyphosate a été impliquée dans une augmentation de la sévérité de certaines maladies, par exemple des fusarioses causées par des champignons *Fusarium* du sol colonisant les racines de soja ; un faisceau d'observations convergentes ont été rapportées dans ce sens (Kremer and Means, 2009). Les causes suggérées pour cette colonisation racinaire accrue peuvent être non seulement directes, par la stimulation de la croissance du champignon, mais également indirectes, par la suppression d'antagonistes bactériens comme les *Pseudomonas* fluorescents, sensibles au glyphosate (Kremer and Means, 2009). En revanche, soulignant ainsi la complexité des interactions en jeu dans la microflore du sol, van den Brink rapporte d'autres études concluant à l'absence d'effet du glyphosate sur l'occurrence de maladies racinaires du soja, incluant *Fusarium solani* f. sp. *Glycines* (van den Brink et al., 2010).

D'un autre côté, l'application de glyphosate peut avoir un effet positif sur la résistance à d'autres maladies des plantes de soja tolérantes au glyphosate : des études ont démontré que l'application du glyphosate sur les variétés de soja tolérantes au glyphosate atténuait la maladie de la rouille asiatique du soja causée par *Phakopsora pachyrhizi* dans des conditions de serre (Feng et al., 2005), et de façon plus variable en champ (Feng et al., 2008).

Plus généralement, des travaux utilisant les outils les plus sensibles de l'écologie microbienne moléculaire (séquençage haut débit de régions hypervariables de gènes ribosomaux amplifiés à partir d'ADN extrait du sol) ont montré que les traitements herbicides à base de glyphosate modifient la structure des communautés bactériennes rhizosphériques des plantes étudiées (Barriuso et al., 2010). Plus particulièrement, les bactéries appartenant aux phyla *proteobacteria* et *actinobacteria* sont négativement affectés par le glyphosate, alors qu'un effet inverse est observé pour les *gammaproteobacteria*. Ces modifications ne s'accompagnent toutefois pas d'une baisse de diversité au sein de la communauté et les auteurs signalent une décroissance progressive des effets observés au fur et à mesure de l'inactivation naturelle du produit, et ce jusqu'à un retour à la structure de la communauté initiale. Il existe donc un très fort potentiel de résilience des sols soumis à une perturbation par un traitement herbicide à base de glyphosate, qui apparaît beaucoup moins agressif sur les communautés bactériennes que l'herbicide Harness[®]GTZ (Acetochlor 41 %, Terbutylazine 19,25 %) (Barriuso et al., 2010).

Les conséquences du système [glyphosate / variétés de soja tolérantes au glyphosate] en termes de biodiversité sont également complexes. Il est prévisible, comme il a été observé en Angleterre dans les *Farm Scale Evaluations*⁴¹ sur les champs de colza, maïs et betterave résistants à des herbicides, que la biodiversité soit localement affectée dans les champs de soja GM tolérants et traités au glyphosate, du fait du meilleur contrôle des adventices par des herbicides non-sélectifs sur des cultures tolérantes comparé au contrôle obtenu avec des herbicides sélectifs sur des cultures non tolérantes. Par voie de conséquence, un meilleur contrôle laisserait moins de plantes adventices dans la parcelle et donc moins de ressources aux espèces vivant aux dépens de celles-là (Gibbons et al., 2006). *A contrario*, comme indiqué plus tôt, la biodiversité des sols, mais également de la faune sauvage, peut s'accroître en conséquence de la réduction du travail des sols. Les effets sur la biodiversité du système de culture engendrés par le couple [glyphosate / variétés de soja tolérantes au glyphosate] sont donc complexes, certains positifs, d'autres négatifs.

⁴¹ <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20080306073937/http://www.defra.gov.uk/environment/gm/fse/results/fse-summary-05.pdf>

5. Coexistence des filières

Traçabilité et étiquetage :

Conformément au Règlement (CE) 1829/2003, des méthodes de détection et de quantification du soja 40-3-2 ont été fournies par le pétitionnaire et validées par le CRL-GMFF (EURL-GMFF)⁴². Du matériel de référence certifié est disponible auprès de l'IRMM⁴³ et des revendeurs. L'identifiant unique communautaire MON-Ø4Ø32-6 a été attribué au soja 40-3-2.

Coexistence :

La biologie du soja implique qu'il ne devrait pas y avoir de problèmes de coexistence entre le soja 40-3-2 et des cultures de soja non transgéniques, si celles-ci se développaient en France métropolitaine. Le pétitionnaire devra se conformer au décret édictant les règles de coexistence.

Dans certains DOM-COM au climat propice aux repousses de soja, il serait bon de veiller, si la culture du soja se développait, à mettre en place des mesures permettant la coexistence entre des plantes de soja génétiquement modifié et ces cultures conventionnelles.

6. Plans de surveillance post-commercialisation

En matière de surveillance post-commercialisation, la Directive 2001/18/CE⁴⁴, complétée par les Règlements (CE) 1829/2003 et 1830/2003⁴⁵, prévoit que soient mis en place :

- un plan de surveillance spécifique, pour tester/confirmer d'éventuelles hypothèses émises lors de l'évaluation des risques pour l'environnement en ce qui concerne l'apparition et l'impact d'effets néfastes potentiels de l'OGM ou de son utilisation. Le plan de surveillance spécifique est destiné à mettre en évidence les changements prévisibles.
- un plan de surveillance générale, pour identifier l'apparition d'éventuels effets néfastes de l'OGM ou de son utilisation sur la santé humaine ou animale ou sur l'environnement qui n'auraient pas été anticipés lors de l'évaluation des risques pour l'environnement. Le plan de surveillance générale vise à mettre en évidence les changements non prévus par les plans de surveillance spécifique.

- Plans de surveillance spécifique

Concernant les aspects sanitaires, le HCB s'accorde avec le pétitionnaire sur le fait qu'aucun problème particulier associé au soja 40-3-2 n'a été identifié (l'allergie possible à certains constituants du soja étant propre au soja et non au soja génétiquement modifié) et que par conséquent, aucun plan de surveillance des santés humaine et animale n'est requis, en dehors du cadre des réseaux de surveillance et des contrôles mis en place par les États membres.

⁴² Community Reference Laboratory for GM Food and Feed of the Joint Research Centre, Laboratoire de référence communautaire du Centre de recherche commun de la Commission Européenne, instauré par le Règlement (CE) 1829/2003, appelé maintenant l'EURL-GMFF (European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed : http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-gmff).

⁴³ Institute for Reference Materials and Measurements : l'un des sept instituts du laboratoire de référence communautaire, <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/homepage.htm>.

⁴⁴ La directive 2001/18/CE est une directive du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 qui fixe les règles communautaires relatives à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement. Elle abroge la directive 90/220/CEE du Conseil. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0018:FR:HTML>

⁴⁵ Le Règlement (CE) 1830/2003 est un règlement du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1830:FR:HTML>

En revanche, concernant les aspects environnementaux, les conclusions du CS du HCB divergent de celles du pétitionnaire, pour lequel aucune surveillance spécifique environnementale n'apparaît nécessaire. Pour le CS du HCB, le risque de développement d'adventices résistantes au glyphosate devrait faire l'objet d'une surveillance spécifique. Ce risque n'est pas un risque direct pour l'environnement en tant que tel, mais il est identifié comme un risque avéré de perte d'efficacité du glyphosate, découlant de mauvaises pratiques agricoles d'utilisation d'un herbicide sur une culture tolérante à cet herbicide, ce qui nécessiterait la mise en œuvre de pratiques alternatives de gestion des mauvaises herbes de cette culture, pouvant inclure l'utilisation d'autres herbicides potentiellement plus dangereux pour l'environnement et la santé que le glyphosate.

- Plan de surveillance générale

La surveillance générale proposée par le pétitionnaire vise à préserver les systèmes écologiques et la biodiversité, les fonctions du sol, l'agriculture durable, la santé des plantes et les santés humaine et animale. Elle reprend les formulations classiques de surveillance à l'aide de questionnaires distribués aux opérateurs, d'observation des réseaux existants, de programmes d'accompagnement spécifique, et d'une veille bibliographique.

Plus précisément, la méthodologie de la surveillance repose sur les entretiens directifs (briefing) des agriculteurs, distributeurs et acteurs liés à la production agricole, la distribution de littérature technique (fascicules, numéro de téléphone gratuit, discussions sur site Internet). Les réseaux ainsi mobilisés sont à même de dégager une vision générale sur l'ensemble de la culture et de vérifier si des anomalies se produisent. Parmi les réseaux en charge de cette surveillance, le pétitionnaire inclut les agriculteurs et leurs organisations.

Le pétitionnaire note que l'étendue de cette surveillance nécessite une coopération avec les Autorités compétentes nationales : il lui faut distinguer le niveau incombant à la surveillance liée à la commercialisation de la culture PGM et le niveau de surveillance du secteur public. Le premier se place au niveau du champ et de la ferme (environnement immédiat), le second au niveau régional ou national. Le pétitionnaire indique que tout doit converger sur les Autorités compétentes qui colligent notamment ses résultats (donnés dans les rapports) et ceux des réseaux existants (météo, épidémiologie, etc.), et sont à même de prendre les décisions qui s'imposent.

Il est prévu de collecter 2500 questionnaires sur une période d'autorisation, soit sur 10 ans. Le CS du HCB demande au pétitionnaire que le plan de surveillance générale s'étende au-delà de la durée d'autorisation. Il demande également que le questionnaire inclue des questions plus explicites concernant les itinéraires de culture des agriculteurs (notamment les programmes d'herbicides et le travail du sol).

La méthodologie de traitement des résultats du questionnaire inclut qu'un seuil de 5 % de réponses mentionnant un effet adverse significatif sera requis pour prendre cet effet en considération. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire et les Autorités compétentes se préoccupent d'une évaluation des risques sur l'environnement même si le taux de réponses aux questionnaires mentionnant des effets négatifs est inférieur à 5 %.

Le traitement statistique des questionnaires repose sur les méthodes préconisées par Wilhem et al. (Wilhelm et al., 2004) et Schmidt et al. (Schmidt et al., 2006).

Si l'autorisation de culture est accordée, des zones pilotes sont envisagées. Elles seront situées dans les régions identifiées comme produisant significativement du soja : la vallée de la Loire et le Sud Ouest de la France, la plaine du Po en Italie et la Roumanie (Il est toutefois précisé que l'introduction du soja 40-3-2 ne sera pas restreinte à ces zones). Les zones pilotes permettront notamment des études de comparaison entre la variété GM et son comparateur non GM. Dans ces régions, il serait intéressant de déterminer le niveau d'allogamie et l'échelle spatiale de dispersion du pollen en relation avec la faune pollinisatrice présente pour vérifier la pertinence des résultats obtenus aux Etats-Unis et au Brésil pour asseoir les règles établies pour la coexistence.

Le CS du HCB remarque un effort d'actualisation du PSPC par le pétitionnaire en 2007, prenant en compte les avancées des réflexions en la matière au niveau européen. Il constate également que le questionnaire a été amélioré entre sa version 2004 et sa version 2007. Il remarque aussi la volonté de coopération du pétitionnaire pour contribuer à la biosurveillance générale placée sous l'égide des Autorités compétentes en leur communiquant les résultats qu'il a obtenus par voie de rapport. Les avancées en matière de PSPC sont notables mais le propos reste encore trop général.

Le CS du HCB demande au pétitionnaire de centraliser les données de surveillance recueillies dans une base centrale de données avec SIG⁴⁶, si possible connectée avec des bases de données du Centre Commun de Recherche de la Commission européenne.

Aucun plan de surveillance des santés humaine et animale n'est décrit dans le dossier. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire se rapproche des Autorités compétentes afin d'établir un plan de surveillance générale des santés humaine et animale, et notamment de préciser la méthodologie et les réseaux à impliquer.

Enfin, au vu de l'expérience acquise sur le continent Nord et Sud américain (16 ans de culture en Amérique du Nord), le CS du HCB demande que soit fourni un bilan rétrospectif de la biosurveillance opérée par le pétitionnaire sur la culture du soja 40-3-2. Une description (1) des paramètres retenus dans l'observation dans le contexte américain et les raisons de cette sélection, (2) du choix des opérateurs réalisant ou supervisant ces observations et des liens avec des réseaux compétents, et (3) de la façon dont il a traité les données et les résultats obtenus, apporterait des précisions appréciables et compléterait utilement les considérations souvent générales portées dans le dossier actuel. Bien que les agricultures américaine et européenne ne soient pas directement comparables, le CS du HCB demande donc au pétitionnaire de fournir toute information disponible sur une éventuelle biosurveillance qu'il aurait diligentée dans le cadre de cette culture en Amérique.

Le CS du HCB rappelle au pétitionnaire qu'il est de son devoir, au cours de la période couverte par l'autorisation, si elle est accordée, d'apporter son concours pour la biosurveillance de la culture du soja 40-3-2, quand celui-ci sera sollicité par le Comité de surveillance biologique du territoire (CSBT) (Décret n° 2008-1282 du 8 décembre 2008 relatif à la création du comité de surveillance biologique du territoire mentionné à l'article L. 251-1 du code rural).

Il est rappelé au pétitionnaire que les rapports aux Autorités compétentes doivent utiliser le formulaire de la décision 2009/770 de la CE (EC, 2009).

7. Conclusions

Au terme de l'analyse de l'ensemble des données fournies par le pétitionnaire et de données supplémentaires disponibles dans la littérature scientifique, le CS du HCB retient que :

- aucun effet particulier de toxicité ni d'allergénicité n'a été observé par le pétitionnaire dans les analyses expérimentales et bioinformatiques de la protéine CP4 EPSPS et du soja 40-3-2. Les études d'alimentarité n'ont pas détecté de différences entre le soja 40-3-2 et son équivalent quasi isogénique non transgénique. Le CS du HCB note que le pétitionnaire conclut à l'équivalence du soja 40-3-2 et son comparateur non transgénique sans avoir mis en œuvre les tests d'équivalence et études de puissance appropriés. Ces informations seront exigées à l'avenir, conformément aux nouvelles lignes directrices sur l'analyse statistique de l'AESA (EFSA, 2010) ;
- aucun impact négatif direct du soja 40-3-2 sur l'environnement n'a été identifié ;
- des effets indirects, dus à l'application du glyphosate sur le soja 40-3-2, ont été rapportés dans la littérature. Ces effets, complexes, contrastés et parfois contradictoires, appellent des recherches supplémentaires, et un suivi attentif durant la culture du soja 40-3-2. Le

⁴⁶ Système d'information géographique capable d'organiser et de présenter des données spatialement référencées.

CS du HCB note que le glyphosate est inscrit à l'annexe I de la Directive 91/414/CEE, et que toute demande d'autorisation de mise sur le marché d'un produit phytopharmaceutique contenant du glyphosate à des fins de désherbage de soja cp4 epsps en France fera l'objet d'une évaluation par l'Anses ;

- en termes de coexistence avec des cultures de soja non transgénique, la dissémination de gènes par pollinisation est peu probable et le risque de repousses est très faible en Europe continentale. Des méthodes permettant de surveiller la coexistence du soja 40-3-2 avec les filières de soja non transgéniques ont été fournies. Le pétitionnaire devra adapter ces mesures en conformité avec le décret édictant les règles de coexistence ;
- des plantes adventices résistantes au glyphosate pourraient se développer en conséquence de mauvaises pratiques agricoles d'utilisation du glyphosate sur le soja 40-3-2. Cette remarque ne concerne pas un impact direct de la modification génétique sur l'environnement, mais souligne le risque de perte d'un outil de gestion des mauvaises herbes, dommageable pour l'agriculteur. Bien que le pétitionnaire ne l'ait pas prévu, le CS du HCB recommande que le risque avéré de développement de plantes adventices résistantes au glyphosate fasse l'objet d'une surveillance spécifique.

Le CS du HCB recommande que, si elle était autorisée, la culture du soja 40-3-2 soit accompagnée de mesures propres à minimiser ce risque de sélection de plantes adventices tolérantes au glyphosate par un encadrement rigoureux des pratiques d'utilisation de cet herbicide total : les Autorités compétentes pourraient édicter des règles de bonnes pratiques agricoles qui permettraient une utilisation durable d'herbicides à base de glyphosate, soit en accompagnement à la décision d'autorisation de mise sur le marché éventuelle d'une formulation de glyphosate à des fins de désherbage de soja cp4 epsps en France, soit en complément à l'avis du MAAP à tous les détenteurs d'autorisations de mise sur le marché pour des spécialités commerciales à base de glyphosate (NOR : AGRG0402105V) (MAAP, 2004).

8. Bibliographie

Abrams, R.I., Edwards, C.R., and Harris, T. (1978). Yields and cross-pollination of soybeans as affected by honey bees and alfalfa leafcutting bees. *American Bee Journal* 118, 555-560.

Abud, S., de Souza, P.I.M., Vianna, G.R., Leonardecz, E., Moreira, C.T., Faleiro, F.G., Junior, J.N., Monteiro, P., Rech, E.L., and Aragao, F.J.L. (2007). Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. *Gen Mol Res* 6, 445-452.

Afssa (2008). Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande de renouvellement de mise sur le marché du soja génétiquement modifié 40-3-2, tolérant au glyphosate (soja dit « round up ready »), pour l'importation, la transformation de graines, ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003. Réponse à la saisine 2008-SA-0098. (Maisons-Alfort).

Arango Isaza, L.M. (2009). Impact of glyphosate application to transgenic Roundup Ready® soybean on horizontal gene transfer of the EPSPS gene to *Bradyrhizobium japonicum* and on the root-associated bacterial community. Dissertation (LMU München: Faculty of Biology).

Barriuso, J., Marin, S., and Mellado, R.P. (2010). Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergence applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbuthylazine. *Environ Microbiol* 12, 1021-1030.

Benbrook, C. (1999). Evidence of the Magnitude and Consequences of the Roundup Ready Soybean Yield Drag from University-Based Varietal Trials in 1998. *Ag BioTech InfoNet* 1.

Brisson, N. (1989). Modèle de simulation de la culture du soja et de son fonctionnement hydrique. Estimation agrométéorologique des potentialités de production (Thèse INA Paris-Grignon).

Brisson, N., Bona, S., and Bouniols, A. (1989). SOYGRO, un modèle de simulation de la culture du soja; adaptation à des variétés cultivées dans le sud de l'Europe et validation [A soybean crop simulation model : validation and adaptation to varieties cultivated in southern Europe. *Agronomie* 9, 27-36.

Chiang, Y.C., and Kiang, Y.T. (1987). Geometric position of genotypes, honeybee foraging patterns and outcrossing in soybean. *Bot Bul Acad Sin* 28, 1-11.

Chiari, W.C., de Toledo, V.D.A., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., de Oliveira, A.J.B., Sakaguti, E.S., Attencia, V.M., Costa, F.M., and Mitsui, M.H. (2005). Pollination of soybean (*Glycine max* L. Merrill) by honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 31-36.

Christou, P., McCabe, D.E., and Swain, W.F. (1988). Stable Transformation of Soybean Callus by DNA-Coated Gold Particles. *Plant Physiol* 87, 671-674.

Cromwell, G.L., Lindemann, M.D., Randolph, J.H., Parker, G.R., Coffey, R.D., Laurent, K.M., Armstrong, C.L., Mikel, W.B., Stanisiewski, E.P., and Hartnell, G.F. (2002). Soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. *J Anim Sci* 80, 708-715.

Delannay, X., Bauman, T.T., Beighley, D.H., Buettner, M.J., Coble, H.D., Defelice, M.S., Derting, C.W., Diedrick, T.J., Griffin, J.L., Hagood, E.S., *et al.* (1995). Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. *Crop Sci* 35, 1461-1467.

Demanèche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., and Simonet, P. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3957-3962.

Duke, S.O., and Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64, 319-325.

EC (2001). Commission Directive 2001/99/EC of 20 November 2001 amending Annex I to Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market to include glyphosate and thifensulfuron-methyl as active substances *Official Journal of the European Communities L304*, 4-16.

EC (2009). Commission decision No 2009/770/EC of 13 October 2009 establishing standard reporting formats for presenting the monitoring results of the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, as or in products, for the purpose of placing on the market, pursuant to Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union L275*, 9-27.

EEC (1991). Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities L230*, 1-32.

EFSA (2010). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs, on request of EFSA, question n° EFSA-Q-2006-080. *The EFSA Journal* 8(1):1250, pp. 59.

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

Elmore, R.W., Roeth, F.W., Kleinz, R.N., Knezevic, S.Z., Martin, A., Nelson, L.A., and Shapiro, C.A. (2001a). Glyphosate-Resistant Soybean Cultivar Response to Glyphosate. *Agron J* 93, 404-407.

Elmore, R.W., Roeth, F.W., Nelson, L.A., Shapiro, C.A., Klein, R.N., Knezevic, S.Z., and Martin, A. (2001b). Glyphosate-resistant soybean cultivar yields compared with sister lines. *Agron J* 93, 408-412.

Erickson, E.H., Berger, G.A., Shannon, J.G., and Robins, J.M. (1978). Honey bee pollination increases soybean yields in the Mississippi Delta region of Arkansas and Missouri. *J Econ Entomol* 71, 601-603.

Erickson, E.H., and Garment, M.B. (1979). Soybean flowers - nectary ultrastructure, nectar guides, and orientation on the flower by foraging honeybees. *J Apic Res* 18, 3-11.

Feng, P.C.C., Baley, G.J., Clinton, W.P., Bunkers, G.J., Alibhai, M.F., Paulitz, T.C., and Kidwell, K.K. (2005). Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17290-17295.

Feng, P.C.C., Clark, C., Andrade, G.C., Balbi, M.C., and Caldwell, P. (2008). The control of Asian rust by glyphosate in glyphosate-resistant soybeans. *Pest Manage Sci* 64, 353-359.

Fok, M., Le Guerroué, J.-L., and Lubello, P. (2010). Un état de coexistence du soja transgénique et conventionnel au Paraná. *Brésil Economie Rurale* 320, 53-68.

Foresman, C., and Glasgow, L. (2008). US grower perceptions and experiences with glyphosate-resistant weeds. *Pest Manage Sci* 64, 388-391.

Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M., and Schonbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13010-13015.

Gass, T., Schori, A., Fossati, A., Soldati, A., and Stamp, P. (1996). Cold tolerance of soybean (*Glycine max* (L) Merr) during the reproductive phase. *Eur J Agron* 5, 71-88.

Gebhard, F., and Smalla, K. (1998). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 1550-1554.

Gibbons, D.W., Bohan, D.A., Rothery, P., Stuart, R.C., Haughton, A.J., Scott, R.J., Wilson, J.D., Perry, J.N., Clark, S.J., Dawson, R.J.G., *et al.* (2006). Weed seed resources for birds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 1921-1928.

Gordon, B. (2007). Manganese nutrition of glyphosate-resistant and conventional soybeans. *Better Crops* 91, 12-13.

Gordon, B. (2008). Manganese nutrition of glyphosate-resistant and conventional soybeans... Setting the record straight (Fact sheet/rebuttal statement). *Better Crops* 91, 12-13.

Hammond, B.G., Vicini, J.L., Hartnell, G.F., Naylor, M.W., Knight, C.D., Robinson, E.H., Fuchs, R.L., and Padgett, S.R. (1996). The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *J Nutr* 126, 717-727.

Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., *et al.* (1996). The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr* 126, 728-740.

HCB (2011). Avis HCB-20110111 du Haut Conseil des biotechnologies relatif au dossier EFSA-GMO-RX-40-3-2 portant sur le renouvellement d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié 40-3-2 pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale (Paris, France), pp. 21.

- Heap, I. (2011). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.com. Accessed July 20, 2011.
- Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002). *In situ* transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68, 3345-3351.
- King, C.A., Purcell, L.C., and Vories, E.D. (2001). Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agron J* 93, 179-186.
- Koelling, P.D., Kenworthy, W.J., and Caron, D.M. (1981). Pollination of male-sterile soybeans in caged plots. *Crop Sci* 21, 559-561.
- Kremer, R.K., and Means, N.E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *Eur J Agron* 31, 153-161.
- Kuklinsky-Sobral, H.L., Araujo, W.L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* 273, 91-99.
- Leach, J.N. (2002). Assessment of the *in vitro* digestibility of purified E-Coli-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid. In Report MSL-17566.
- Loecker, J.L., Nelson, N.O., Gordon, W.B., Maddux, L.D., Janssen, K.A., and Schapaugh, W.T. (2010). Manganese response in conventional and glyphosate resistant soybean. *Agron J* 102, 606-611.
- MAAP (2004). Avis à tous les détenteurs d'autorisations de mise sur le marché pour des spécialités commerciales à base de glyphosate (ou N phosphonométhyl glycine). NOR : AGRG0402105V. Journal officiel de la République française *Texte 83 sur 84*.
- Mason, C.E. (1979). Honey bee foraging activity on soybeans in Delaware. Paper presented at: 4th Int Symp Pollination (College Park, MD, Md. Agric. Exp. Sta. Spec. Misc. Publ. 1).
- Matthews, D.J., and Hayes, P. (1982). Effect of temperature on germination and emergence of six cultivars of soybean (*Glycine max*). *Seed Science and Technology* 10, 547-555.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., and Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio-Technology* 6, 923-926.
- McClain, J.S., and Silvanovich, A. (2008). Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site of Soybean 40-3-2: A BLASTn Analysis. In Monsanto Technical Report, RAR-08-560, pp. 1-31.
- McClain, J.S., Taylor, J.P., and Masucci, J.D. (2007). Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site of Soybean 40-3-2. In Monsanto Technical Report MSL0020954, pp. 1-35.
- McCoy, R.L., and Silvanovich, A. (2003). Bioinformatics analysis of the CP4 EPSPS protein utilizing the AD4, Toxin5 and ALLPEPTIDES databases. In Technical report MSL-18752.
- Naylor, M.W. (1993). One month feeding study with processed glyphosate-tolerant soybean meal in Sprague Dawley rats. In Report MSL-12800.
- Ortiz-Perez, E., Horner, H.T., Hanlin, S.J., and Palmer, R.G. (2006a). Evaluation of insect-mediated seed set among soybean lines segregating for male sterility at the *ms6* locus. *Field Crops Res* 97, 353-362.

- Ortiz-Perez, E., Horner, H.T., Hanlin, S.J., and Palmer, R.G. (2006b). Insect-mediated seed-set evaluation of 21 soybean lines segregating for male sterility at 10 different loci. *Euphytica* **152**, 351-360.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavalley, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., *et al.* (1995). Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-tolerant Soybean Line. *Crop Sci* **35**, 1451-1461.
- Paget, E., and Simonet, P. (1994). On the track of natural transformation in soil FEMS *Microbiol Ecol* **15**, 109-117.
- Planchon, C. (1986). In *Le soja : Physiologie de la plante et adaptation aux conditions françaises*, CETIOM-INRA, ed.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T.M., and Monier, J.M. (2009). Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3314-3322.
- Powell, J.R., Campbell, R.G., Dunfield, K.E., Gulden, R.H., Hart, M.M., Levy-Booth, D.J., Klironomos, J.N., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T., *et al.* (2009). Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum*, and genetically modified soybean. *Applied Soil Ecology* **41**, 128-136.
- Powles, S.B. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manage Sci* **64**, 360-365.
- Ray, J., Kilen, T.C., Abel, C.A., and Paris, R.L. (2003). Soybean natural cross-pollination rates under field conditions. *Environ Biosafety Res* **2**, 133-138.
- Reddy, K.N., and Zablotowicz, R.M. (2003). Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. *Weed Sci* **51**, 496-502.
- Rizzi, A., Pontiroli, A., Brusetti, L., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G.A., Vogel, T.M., Simonet, P., Bazzicalupo, M., *et al.* (2008). Strategy for *in situ* detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1250-1254.
- Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R., and Fuchs, R.L. (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready® soybeans. *Food Control* **10**, 407-414.
- Roumet, P., and Magnier, I. (1993). Estimation of hybrid seed production and efficient pollen flow using insect pollination of male sterile soybeans in caged plots. *Euphytica* **70**, 61-67.
- Rust, R.W., Mason, C.E., and Erickson, E.H. (1980). Wild bees on soybeans, *Glycine max*. *Environ Entomol* **9**, 230-232.
- Schmidt, K., Beißner, L., Schiemann, J., and Wilhelm, R. (2006). Methodology and tools for data acquisition and statistical analysis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **1**, 21-25.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Guiamet, J.J., Beltrano, J., and Araus, J.L. (2004). Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Sci* **167**, 19-26.
- Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima, J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J., and Toyoda, M. (2000). Effect of GM and non-GM soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. *J Food Hyg Soc Japan* **41**, 188-193.

Unander, D.W., Lambert, J.W., and Orf, J.H. (1983). Cool temperature soybean germination: Genetic and environmental components. *Amer Soc Agron Abstr* (Madison, WI), 83-84.

van den Brink, L., Bus, C.B., Franke, A.C., Groten, J.A.M., Lotz, L.A.P., Trimmer, R.D., and van de Wiel, C.C.M. (2010). Inventory of observed unexpected environmental effects of genetically modified crops, A.P.R. DLO Foundation, ed. (Wageningen, NL), pp. 80.

Wagner, T., Arango Isaza, L., Grundmann, S., Dörfler, U., Schroll, R., Schloter, M., Hartmann, A., Sandermann, H., and Ernst, D. (2008). The Probability of a Horizontal Gene Transfer from Roundup Ready[®] Soybean to Root Symbiotic Bacteria: A Risk Assessment Study on the GSF Lysimeter Station. *Water, Air, Soil Pollut Focus* 8, 155-162.

Wilhelm, R., Beissner, L., Schmidt, K., Schmidtke, J., and Schiemann, J. (2004). Monitoring des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen - Fragebögen zur Datenerhebung bei Landwirten. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 56, 184-188.

Zhu, Y.Z., Li, D.F., Wang, F.L., Yin, J.D., and Jin, H. (2004). Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. *Arch Anim Nutr* 58, 295-310.

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de
l'alimentation

Service de la prévention
des risques sanitaires de
la production primaire

Sous direction de la
qualité et de la protection
des végétaux

Bureau de la
biovigilance, des
biotechnologies et de la
qualité des végétaux

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Madame BRECHIGNAC
Présidente du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

23 MARS 2011

Paris, le

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur des dossiers de demande de mise sur le marché d'OGM pour la culture

Références : 110310-saisine HCB- dossiers culture

Affaire suivie par : Anne Grevet
tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49
courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

PJ :

Madame la Présidente,

Dans le cadre du règlement 1829/2003 relatif aux denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Pendant cette période d'évaluation, l'AESA consulte les États membres sur les dossiers. Lorsque l'AESA a rendu un avis, la Commission européenne propose au vote des États membres un projet de décision.

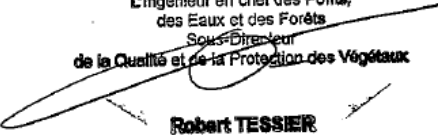
Les dossiers suivants sont susceptibles de faire prochainement l'objet d'un avis de l'AESA, qui sera suivi d'un vote des États membres sur un projet de décision :

- dossier **EFSA-GMO-UK-2005-17**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **1507xNK603** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-NL-2005-23**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **59122** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-NL-2005-24**, concernant la mise sur le marché du soja génétiquement modifié **40-3-2** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-NL-2005-26**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **NK603xMON810** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-NL-2005-28**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **1507x59122** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

- dossier **EFSA-GMO-UK-2006-30**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **59122x1507xNK603** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossiers **EFSA-GMO-NL-2007-46** et **EFSA-GMO-RX-T25**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **T25** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-CZ-2008-54**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **MON88017** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.
- dossier **EFSA-GMO-UK-2008-60**, concernant la mise sur le marché du maïs génétiquement modifié **GA21** pour la culture, l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ces dossiers afin de rendre un avis au plus tard **le 30 septembre 2011 pour les dossiers à traiter en priorité : EFSA-GMO-NL-2005-24 (soja 40-3-2) et EFSA-GMO-UK-2008-60 (maïs GA21), et au plus tard le 31 décembre 2011 pour les autres dossiers.** Ces échéances sont susceptibles d'évoluer en fonction du calendrier communautaire.

Je vous prie de croire, Madame la Présidente, à l'assurance de ma considération distinguée.

L'ingénieur en chef des Ponts,
des Eaux et des Forêts
Sous-Directeur
de la Qualité et de la Protection des Végétaux

Robert TESSIER

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

L'avis a été élaboré par le CS du HCB, composé de :

Jean-Christophe Pagès, Président, Jean-Jacques Leguay, Vice-Président,

par ordre alphabétique des noms de famille : Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, Florence Coignard, François-Christophe Coléno, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Nicolas Ferry, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Jestin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Yvon Le Maho, Stéphane Lemarié, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Bertrand Ney, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec son analyse du dossier.

Deux rapporteurs extérieurs, Xavier Pinochet, du CETIOM, et Jacques Gasquez, de l'INRA, ont été sollicités pour compléter l'expertise du CS. MM. Pinochet et Gasquez ont signé un engagement de confidentialité, et ont certifié ne pas avoir de conflits d'intérêts après avoir pris connaissance du dossier. Ils ont fourni une analyse du dossier dans leur domaine d'expertise, et ont été auditionnés par le CS. Ils n'ont toutefois pas contribué directement à la rédaction de l'avis du CS.