

HAUT CONSEIL DES BIOTECHNOLOGIES

COMITE SCIENTIFIQUE

Paris, le 7 décembre 2011

AVIS

en réponse à la saisine **110915-saisine HCB- dossier 2011-91**¹
concernant le dossier **EFSA-GMO-NL-2011-91**.

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 16 septembre 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-2011-91 portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié DAS-68416-4 à des fins d'importation, transformation, et utilisation en alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par la société Dow AgroSciences dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003 auprès de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA), sous la référence **EFSA-GMO-NL-2011-91**. La saisine du HCB correspondante est référencée **110915-saisine HCB- dossier 2011-91**.

Dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est centralisée par l'AESA. Les Etats membres disposent de trois mois pour envoyer leurs commentaires en contribution à l'évaluation du dossier. Dans ce cadre, le HCB est invité à envoyer un avis sous forme de commentaires à destination de l'AESA d'ici le 5 décembre.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a procédé à l'examen du dossier le 8 novembre 2011 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Les commentaires du HCB à destination de l'AESA sont transmis par ce rapport aux Autorités compétentes françaises.

¹ La saisine « **110915-saisine HCB- dossier 2011-91** » est reproduite dans l'Annexe 1.

² La composition du CS est indiquée dans l'Annexe 2.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
1.1. CONTEXTE ET ENJEU DE LA SAISINE	3
1.2. PRÉSENTATION DU DOSSIER	4
2. COMMENTAIRES À DESTINATION DE L’AESA	4
2.1. REMARQUES GÉNÉRALES	4
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DÉFINIES PAR L’AESA	4
3. BIBLIOGRAPHIE	10
ANNEXE 1 : SAISINE	12
ANNEXE 2 : ELABORATION DES COMMENTAIRES	13
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS À DESTINATION DE L’AESA ...	14
A3.1. GENERAL COMMENTS.....	14
A3.2. COMMENTS PER SECTION.....	14

1. Introduction

1.1. Contexte et enjeu de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 16 septembre 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-2011-91, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié DAS-68416-4 à des fins d'importation, transformation, et utilisation en alimentation humaine et animale. Le dossier EFSA-GMO-NL-2011-91 a été déposé par la société Dow Agrosiences dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003³ (EC, 2003) auprès de l'AESA⁴.

Dans le cadre du Règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées est centralisée par l'AESA, qui doit transmettre son opinion à la Commission européenne dans un délai de six mois à compter de la date de validation du dossier – en pratique, cette période de six mois peut être allongée au cas où une demande d'information supplémentaire est adressée au pétitionnaire. Les Etats membres disposent d'un délai ferme de trois mois pour envoyer leurs commentaires en contribution à l'évaluation du dossier. C'est dans ce cadre que le HCB a été saisi ; l'avis du HCB prend donc la forme de commentaires à destination de l'AESA.

L'enjeu de cet avis du HCB est donc de contribuer à l'évaluation du dossier par l'AESA. Les commentaires des Etats membres, dès réception par l'AESA, sont transmis d'une part aux experts de trois groupes de travail du panel OGM⁵ de l'AESA (Analyse moléculaire, Alimentation humaine et animale, Environnement), et d'autre part à l'Etat membre auquel l'AESA a délégué l'évaluation du risque environnemental. En l'occurrence, la culture étant exclue du champ de demande d'autorisation de ce dossier, l'AESA a choisi de ne pas déléguer cette évaluation.

Les groupes de travail de l'AESA examinent les commentaires des Etats membres, les intègrent dans leur analyse des dossiers, et, quand ils le jugent pertinent, les transmettent au pétitionnaire sous forme de questions pour clarification ou demande d'information supplémentaire. Si tous les commentaires ne sont pas nécessairement transmis au pétitionnaire, ils font tous l'objet d'une réponse spécifique par l'AESA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'AESA, sont rendus publics, en annexe de l'opinion scientifique de l'AESA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'AESA est strictement cadrée. Les Autorités compétentes des Etats membres sont invitées à poster des commentaires en ligne, en anglais, dans des formulaires distincts pour chaque section des dossiers. Les sections sont basées sur la structure des dossiers recommandée dans les lignes directrices de l'AESA relatives à l'évaluation environnementale des plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2006)⁶. Ces commentaires doivent être ciblés sur des demandes spécifiques adressées à l'AESA, soit pour une demande de clarification ou d'information supplémentaire de la part du pétitionnaire, soit pour la prise en compte de remarques spécifiques dans son évaluation des dossiers et l'élaboration de son opinion scientifique.

Par cet avis, le Comité scientifique (CS) du HCB transmet aux Autorités compétentes françaises des commentaires destinés à l'AESA en français, avec une traduction en anglais présentée en annexe.

³ Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. (Plus précisément, pour clarifier une confusion inhérente à la traduction française de ce titre, ce règlement concerne les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, ces denrées alimentaires ou aliments pouvant consister en des OGM, contenir des OGM, ou être issus d'OGM.) : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003R1829:FR:HTML>.

⁴ AESA : Autorité européenne de sécurité des aliments, ou EFSA : *European Food Safety Authority*.

⁵ OGM : organismes génétiquement modifiés.

⁶ La dernière version de ces lignes directrices EFSA (2011). Scientific Opinion on Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. The EFSA Journal 9 (5): 2150, 37 pp. ., adoptée en avril 2011, n'a pas encore été intégrée dans le processus.

1.2. **Présentation du dossier**

Le soja génétiquement modifié DAS-68416-4 exprime les enzymes AryloxyAlcanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) et Phosphotricine Acetyl Transferase (PAT). L'enzyme AAD-12 dégrade l'herbicide 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) en 2,4- dichlorophenol (DCP) inactif, et l'enzyme Phosphotricine Acetyl Transferase (PAT) inactive les herbicides non sélectifs à base de glufosinate-ammonium. L'herbicide 2,4-D est actif sur les dicotylédones, et essentiellement utilisé sur cultures de monocotylédones qui y sont peu sensibles. Il provoque une croissance anormale de la jeune plante entraînant sa mort.

Les gènes *aad-12* et *pat* ont été isolés des bactéries *Delftia acidovorans* et *Streptomyces viridochromogenes*, respectivement. L'ADN de transfert (ADN-T) portant les deux cassettes permettant l'expression des gènes *aad-12* et *pat* est présent en un locus d'insertion et en une copie unique. Le caractère est stable au cours des générations d'auto-fécondations et de croisements. Aucun autre transgène que ceux portés par l'ADN-T n'est présent dans le soja DAS-68416-4. L'insertion n'interrompt pas de séquences codantes ou régulatrices connues ou reconnaissables du soja.

Le pétitionnaire présente dans ce dossier l'évaluation des risques environnementaux et sanitaires de l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale du soja DAS-68416-4 en Europe. Le CS du HCB propose d'envoyer les remarques suivantes à l'AESA concernant les points du dossier identifiés comme critiquables.

2. **Commentaires à destination de l'AESA**

2.1. **Remarques générales**

1. Le CS du HCB demande qu'une étude de toxicité orale à doses répétées sur rongeurs sur 90 jours soit réalisée pour évaluer la toxicité du tourteau de soja conformément aux lignes directrices de l'OCDE.
2. Les tests statistiques de comparaison mis en œuvre permettent uniquement de conclure à l'absence de différences statistiquement significatives. Aucune étude de puissance n'est proposée, aucun test d'équivalence n'est réalisé. Les recommandations de l'AESA pour les analyses de composition (EFSA, 2010) ne sont pas suivies. Les conclusions d'équivalence en substance du soja DAS-68416-4 avec ses comparateurs non génétiquement modifiés ne sont donc pas justifiées.
3. Le dossier ne se réfère qu'à une importation dans les régions de l'Union européenne de climat tempéré. Le pétitionnaire devrait systématiquement considérer dans son évaluation de risques et dans ses plans de surveillance que l'Union européenne comprend également des territoires en zones tropicales propices à la culture et à la survie du soja. C'est par exemple le cas pour certains des DROM-COM (Départements, Régions et Collectivités d'Outre Mer) du territoire français, comme la Guyane française.

2.2. **Commentaires par sections définies par l'AESA**

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections de dossier définies par l'AESA, et aux différents formulaires mis à disposition par l'AESA pour la collecte de commentaires en ligne. Seules les sections pour lesquelles le HCB transmet des commentaires sont indiquées ici. Chaque commentaire est écrit de manière indépendante. La somme des commentaires n'est pas destinée à constituer un texte en soi.

B. INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL PLANTS

4. Dissemination

(a) ways and extent of dissemination

L'ensemble des études sur lesquelles se base le dossier provient principalement du continent américain, et aucune n'a pris soin de quantifier la faune pollinisatrice présente dans l'Union européenne, ni les caractéristiques intrinsèques des variétés considérées, le taux d'autogamie dépendant du niveau de cléistogamie de la variété.

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., 2006; 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.

(b) special factors affecting dissemination, if any

Cette section, qui ne fait que renvoyer à la section B.4, mériterait d'être étayée.

5. Geographical distribution and cultivation of the plant, including the distribution in Europe of the compatible species

Le CS du HCB s'accorde avec le pétitionnaire sur le fait qu'il n'existe pas d'espèces sauvages voisines (*Glycine soja*) des variétés de soja cultivé [*Glycine max* (L.) Merr] en Europe « continentale ». Le dossier devrait toutefois également traiter le cas des territoires d'outre-mer de l'Union européenne propices à la culture et à la survie du soja, et indiquer si des espèces apparentées au soja pourraient s'y trouver en conjonction avec une culture potentielle de soja.

D. INFORMATION RELATING TO THE GM PLANT

6. Any change to the ability of the GM plant to transfer genetic material to other organisms

(a) Plant to bacteria gene transfer

Les arguments présentés par le pétitionnaire (p. 64-65) peuvent globalement être acceptés en l'état. On peut cependant indiquer que le mécanisme le plus susceptible de permettre un transfert d'ADN entre la plante et des bactéries est la transformation bactérienne. Bien qu'il n'y ait pas eu de démonstration au champ, des démonstrations de transfert en conditions de laboratoire proches de celles de l'environnement montrent qu'il n'y a aucune raison d'exclure que de tels événements de transfert puissent se réaliser dans la nature. En effet, des travaux réalisés en laboratoire et en serres sur des modèles d'étude composés de plantes transgéniques variées et de quelques bactéries naturellement transformables utilisées comme réceptrices ont montré qu'un transfert du transgène aux bactéries de l'environnement est susceptible de se réaliser à des fréquences suffisamment élevées pour être détectables (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). Cette possibilité de transfert d'ADN transgénique à des fréquences significatives, donc détectables, est limitée aux séquences procaryotiques qui s'intègrent par recombinaison homologue ou homéologue dans les régions de forte similarité nucléotidique présentes dans les génomes bactériens (et potentiellement des Archeae). On ne peut absolument pas fournir de fréquences de transfert comme le fait le pétitionnaire.

En plein champ, on ne peut détecter des événements de transfert car les méthodes de détection manquent de sensibilité et de spécificité, notamment du fait de la présence naturelle, et en grande quantité, des gènes concernés dans les génomes bactériens telluriques.

Les séquences transgéniques de ce soja proviennent de *Delftia acidovorans* (ou *Comamonas acidovorans*) qui appartient à l'ordre des *Pseudomonadales* et à la famille des *Pseudomonadaceae*, bactéries très répandues dans différents types d'environnements (sols, sédiments, boues activées, etc.). *Streptomyces viridochromogene* est une bactérie commune du sol. Les séquences transgéniques de ce soja rentrent donc dans la catégorie des régions d'ADN pouvant être transférées à des bactéries à des fréquences plus élevées que les autres gènes de la plante. Cette caractéristique leur confère deux propriétés contrastées vis-à-vis de la problématique du transfert d'ADN du transgène :

1. L'occurrence élevée de ces bactéries donatrices des gènes dans le sol signifie d'abord qu'il y aura dans les génomes des bactéries telluriques de nombreuses séquences de totale similarité avec l'ADN du transgène sur lesquelles pourra s'amorcer la recombinaison homologue et donc se réaliser le transfert entre la plante transgénique et les bactéries. Dans la majorité des cas, cet événement conduirait à remplacer une copie indigène par la copie provenant de la plante, sans conséquence notable sur l'expression. Si le gène était transféré avec ses séquences promotrices et de terminaison (d'origine végétale), il ne pourrait être exprimé dans un contexte procaryotique et le segment transféré deviendrait un fardeau génétique susceptible d'être contre-sélectionné. La question se pose toutefois plus particulièrement pour le symbiote fixateur d'azote *Bradyrhizobium japonicum* qui se développe au sein des nodosités racinaires du soja. Du fait que cette bactérie n'est pas naturellement transformable génétiquement, la probabilité d'événements de transfert est extrêmement faible.
2. La présence dans le sol à des niveaux populationnels élevés de bactéries pourvues des séquences similaires à celles des transgènes signifie aussi que l'acquisition par une bactérie d'une copie fonctionnelle d'une séquence transgénique n'aura qu'une probabilité très faible de modifier la structure de la communauté bactérienne tellurique déjà pourvue d'un nombre élevé de bactéries possédant naturellement le même gène (qui peut être échangé par transfert horizontal entre différentes bactéries de la communauté).

Le commentaire du pétitionnaire sur le transfert aux cellules humaines est relativement hors contexte. Il était jusque-là question d'un transfert aux bactéries de l'environnement. Un transfert aux cellules humaines est encore plus improbable. Des travaux avaient été réalisés pour déterminer si des bactéries (notamment pathogènes) pouvaient être des vecteurs pour faire de la thérapie génique. Aller imaginer qu'il faudrait d'abord un transfert des plantes vers les bactéries puis des bactéries aux cellules humaines fait tomber les fréquences à des valeurs infinitésimales. Un transfert direct vers les cellules humaines avec de l'ADN de plantes est aussi à exclure, l'ADN extracellulaire étant alors soumis à une dégradation extrêmement importante.

Le CS du HCB est en accord avec la conclusion du pétitionnaire sur la présence naturelle des transgènes considérés dans l'environnement, et sur l'absence de risque associé à un éventuel transfert horizontal de ces transgènes.

(b) Plant to plant gene transfer

Le dossier ne présente quasi aucune des données disponibles dans la littérature sur les niveaux de pollinisation croisée, et rien n'est dit sur la faune pollinisatrice.

Il faudrait notamment mentionner une étude brésilienne d'Abud et al. (2007) réalisée au champ qui mentionne un taux moyen d'allogamie sur le rang voisin de 0,52 %, 0,12 % sur le rang suivant et rien à 10 mètres de la source. Il est probable que les taux de pollinisation croisée varient en fonction de la faune pollinisatrice. Les fleurs de soja produisent du nectar (Erickson and Garment, 1979), et sont 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 excellent pollinisateur du soja en conditions contrôlées (Ortiz-Perez et al., 2006; Roumet and Magnier, 1993), tout comme l'abeille domestique (Koelling et al., 1981).

7. Information on any toxic, allergenic or other harmful effects on human or animal health arising from the GM food/feed

7.3 Selection of material and compounds for analysis

La plupart des valeurs moyennes mesurées dans les différents sites pour le soja DAS-68416-4 traité ou non aux herbicides et le soja contrôle non GM s'inscrivent dans les limites de variations rapportées dans la littérature et/ou dans les limites de variations des soja non GM de référence (Pioneer 93M62, LG Seeds C3884N, Arise 9E394, Phillips 363, Hisoy 38C60, et Hoffman H387). Un nombre limité de différences significatives est observé en fonction du traitement herbicide mais elles ne sont pas considérées significatives en termes de composition car elles sont comprises dans les limites de variations rapportées dans la littérature pour les soja non GM.

Le pétitionnaire conclut dans ces termes (p. 102) :

"unsprayed DAS-68416-4 soybean, DAS-68416-4 soybean + 2,4-D, DAS-68416-4 soybean + glufosinate, and DAS-68416-4 soybean + both soybean composition results confirm equivalence of DAS-68416-4 soybean (Event DAS-68416-4) soybean to conventional soybean lines."

Les tests mis en œuvre permettent uniquement de conclure à l'absence de différences statistiquement significatives. Une analyse de puissance devrait être effectuée pour pouvoir conclure à l'absence de différences biologiquement significatives, et des tests d'équivalence devraient être utilisés pour pouvoir conclure à l'équivalence des soja.

7.7 Anticipated intake/extent of use

Le pétitionnaire précise (p. 108-109) que les usages anticipés du soja DAS-68416-4 et de ses produits dérivés utilisables dans l'alimentation humaine ou animale ne seront pas différents de ceux des variétés commerciales de soja non GM. Il est notamment souligné que dans l'UE, la majorité des produits dérivés du soja (principalement le grain, l'huile et la farine) sont destinés à l'alimentation animale et qu'il n'existe pas d'usage du soja non transformé en alimentation humaine du fait de la présence de facteurs anti-nutritionnels comme les inhibiteurs trypsiques et les lectines. Considérant les températures élevées employées dans les procédés de transformation, des quantités négligeables de protéines sont attendues dans les produits de transformation.

Le CS du HCB fait deux remarques à ce sujet :

1. Le dossier indique que tous les procédés de transformation du soja pour l'alimentation humaine mettent en jeu des températures élevées. Cette affirmation devrait être consolidée par un argumentaire.
2. Le dossier présente une étude de la stabilité thermique de la protéine AAD-12 (Schafer, 2010) indiquant que le chauffage pendant 30 minutes à 50, 70 et 95°C élimine son activité enzymatique et 99 % de son immuno-réactivité. En revanche, le CS du HCB note que les effets du chauffage sur la protéine PAT ne sont pas indiqués et demande au pétitionnaire de compléter cette lacune.

Il est également indiqué (p. 109) que bien que le soja DAS-68416-4 exprime aussi la protéine PAT, l'évaluation du risque alimentaire présentée dans le dossier ne se concentre pas sur celle-ci car il a été établi que cette protéine est sans danger pour l'homme, l'animal et l'environnement, et qu'elle bénéficie de nombreuses autorisations réglementaires accordées de longue date. En conséquence, seul un résumé de l'exposition alimentaire de l'homme et du bétail à la protéine AAD-12 du soja DAS-68416-4 est présenté.

Au regard de cette indication, le CS du HCB souhaiterait qu'un rappel des données sur la protéine PAT figure clairement dans le dossier, avec les références correspondantes, notamment concernant les données qui ont été validées par les instances réglementaires. Le dossier est bancal sur ce point : certains éléments sur la protéine PAT sont relativement détaillés (allergénicité, caractérisation biochimique, etc.) tandis que d'autres sont partiels et sans référence vérifiable (notamment les études de toxicité (voir section 7.8)

7.8 Toxicology

7.8.1 Safety assessment of newly expressed proteins

L'évaluation de la protéine AAD-12 a été menée de façon relativement exhaustive avec un volet de caractérisation biochimique (identité, mode d'action, spécificité enzymatique, stabilité thermique, comparaison des protéines du soja et microbienne, glycosylation, etc.).

Le dossier fournit une étude de toxicité orale aigue sur souris et une étude orale de toxicité répétée sur souris limitée à 28 jours (p. 126-127). Le CS du HCB note que cette dernière étude (Thomas et al., 2010) respecte les standards de qualité (BPL, conformité aux lignes directrices internationales) et inclut des examens exhaustifs de l'état sanitaire des animaux (incluant notamment des analyses hématologiques et biochimiques ainsi que des examens anatomopathologiques).

Bien qu'il soit indiqué dans la section 7.7 que les données sur la protéine PAT ne sont pas décrites dans le dossier puisque validées de longue date par les instances réglementaires, un paragraphe est consacré à la toxicité de cette protéine pour les mammifères et ne fait apparaître qu'une étude de toxicité orale aigue chez la souris. Il n'est pas clair si cette étude de toxicité orale aigue, à laquelle la référence « Brooks et al., 2000 » est accolée, dont le document ne figure ni dans la bibliographie ni dans les annexes du dossier, est celle qui a été retenue et validée par les instances réglementaires. De plus, aucune mention n'est faite sur la toxicité à plus long terme.

7.8.4 Testing of the whole GM food/feed

Le CS du HCB demande qu'une étude de toxicité orale à doses répétées sur rongeurs sur 90 jours soit réalisée conformément aux lignes directrices de l'OCDE (OECD, 1998) sur le tourteau de soja pour tester la toxicité de la combinaison des deux protéines dans le contexte d'une plante entière.

7.10 Nutritional assessment of GM food/feed

7.10.1 Nutritional assessment of GM food

Le pétitionnaire invoque l'équivalence de composition et l'équivalence nutritionnelle du soja DAS-68416-4 et du soja non GM pour estimer que l'apport alimentaire attendu en soja DAS-68416-4 et produits dérivés ne devrait pas être modifié.

Le CS du HCB rappelle que les tests mis en œuvre permettent uniquement de conclure à l'absence de différences statistiquement significatives. Seuls des tests d'équivalence devraient être utilisés pour pouvoir conclure à l'équivalence en composition ou nutritionnelle des soja. A cette réserve près, la conclusion du pétitionnaire sur l'apport alimentaire du soja DAS-68416-4 dans l'alimentation humaine paraît légitime.

7.10.2 Nutritional assessment of GM feed

Un essai de 42 jours conduit sur 120 poulets (12 séries de 10 poulets chacune) répartis en 3 lots (un lot nourri avec du soja DAS-68416-4, un lot nourri avec la lignée isogénique de soja non GM, un lot nourri avec des sojas non GM: LG C3540, Pioneer 93B82 et HiSoy 38C60, a permis d'analyser l'évolution du poids corporel, de la prise de nourriture et de l'état de santé général des animaux. A la fin de chaque phase (démarrage, croissance et finition) et à la fin de l'essai les performances (gain de poids, prise de nourriture et ratio) des animaux des 3 lots ont été comparées. Quatre animaux de chaque série ont été sacrifiés et l'analyse a porté sur le poids des carcasses, des blancs, des cuisses, des ailes, du foie et de la graisse abdominale.

Aucune différence significative n'a été observée entre les poulets nourris avec du soja DAS-68416-4 et ceux nourris avec du soja non GM, concernant les différents paramètres analysés à l'exception de la prise de nourriture journalière des mâles nourris avec le soja DAS-68416-4 qui est inférieure de 3,7 % à celle des mâles nourris avec du soja non GM. Cette différence ne s'observe que chez les mâles et n'affecte pas leurs performances. Quelques autres rares différences significatives concernant les blancs et les cuisses ont été enregistrées chez les

animaux nourris avec des aliments commerciaux contenant du soja non GM, mais elles ne s'observent pas avec tous les sojas non GM (LG C3540, Pioneer 93B82 et HiSoy 38C60).

Le CS du HCB rappelle que, dans un cadre de comparaisons multiples, il est effectivement attendu d'observer des "faux-positifs" (5 % sous l'hypothèse nulle). Des techniques de type FDR (False Discovery Rate) permettent le contrôle du taux de faux positifs.

Le pétitionnaire conclut (p. 142) :

"These results indicate that DAS-68416-4 soybean is nutritionally equivalent to the non-transgenic near-isogenic control."

Le CS du HCB rappelle que les tests mis en œuvre permettent uniquement de conclure à l'absence de différences statistiquement significatives. Une analyse de puissance devrait être effectuée pour pouvoir conclure à l'absence de différences biologiquement significatives, et des tests d'équivalence devraient être utilisés pour pouvoir conclure à l'équivalence nutritionnelle du soja DAS-68416-4 et ses comparateurs non GM.

9. Potential changes in the interactions of the GM plant with the biotic environment resulting from the genetic modification

9.1 Persistence and invasiveness

p. 146 :

"Based on centuries of experience with conventional, domesticated soybean in Europe, there is no potential for soybean to be invasive of natural habitats or persist in the agricultural environment without the aid of human intervention. Soybean is a poor competitor, which outside of cultivation has no meaningful impact on biodiversity or the environment (OECD, 2000; Abel, 1970)."

Les conditions thermiques conditionnent en partie le développement de repousses. Le soja ne supportant pas le froid, on peut anticiper que les repousses apparues avant l'hiver suite à un échappement de graines de la filière d'importation ne survivront pas aux conditions hivernales que l'on trouve communément en Europe. Cette affirmation devra être révisée dans un contexte de réchauffement climatique. De plus, elle ne s'applique pas à certains territoires d'outre-mer de l'Union européenne dont certains des DROM-COM français situés en conditions tropicales.

p. 147 :

"The advantage is of purely agronomic interest and presents negligible risk to the non-agricultural environments, because of the poor survival characteristics of soybean under most European conditions."

L'avantage sélectif conféré au soja DAS-68416-4 en présence des herbicides à base de 2,4-D et glufosinate-ammonium devrait être discuté dans un contexte de traitement des bordures des champs et des chemins. Si la présence de repousses de soja hors des champs est actuellement peu documentée, l'ajout d'herbicide, notamment de glufosinate, comme agent de gestion des bords de champs et de chemins n'est pas rare en France.

9.2 Selective advantage or disadvantage

L'avantage sélectif conféré au soja DAS-68416-4 en présence des herbicides à base de 2,4-D et glufosinate-ammonium devrait être discuté dans un contexte de traitement des bordures des champs et des chemins.

9.3 Potential for gene transfer

Il est demandé au pétitionnaire d'étendre son analyse aux territoires d'outre-mer de l'Union européenne.

11. Environmental Monitoring Plan

11.4 General surveillance for unanticipated adverse effects

Comme pour l'évaluation environnementale, les plans de surveillance devraient considérer les conditions tropicales propices à la culture et à la survie du soja que l'on trouve dans certains territoires d'outre-mer de l'Union européenne.

3. 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.

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.

EC (2003). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* L268, 1-23.

EFSA (2006). Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal* 99, 1-100.

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, 59 pp.

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

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.

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

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.

Koelling, P.D., Kenworthy, W.J., and Caron, D.M. (1981). Pollination of male-sterile soybeans in caged plots. *Crop Sci* 21, 559-561.

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).

OECD (1998). OECD guideline for the testing of chemicals - Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. n°408.

Ortiz-Perez, E., Horner, H.T., Hanlin, S.J., and Palmer, R.G. (2006). Insect-mediated seed-set evaluation of 21 soybean lines segregating for male sterility at 10 different loci. *Euphytica* 152, 351-360.

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.

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.

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.

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.

Schafer, B.W. (2010). Summary of the effect of heat treatment on a recombinant aryloxyalkanoate dioxygenase-12 protein. In Dow AgroSciences LLC Laboratory study ID: 101047 (Indianapolis, Dow AgroSciences LLC).

Thomas, J., Brooks, K.S., and Sura, R. (2010). 28 dietary toxicity study in CRL:CD1(ICR) mice. In Dow AgroSciences LLC Laboratory study ID: 091024 (Indianapolis).

Annexe 1 : Saisine



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE, DE LA RURALITÉ ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE

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

Monsieur DHAINAUT
Président du Haut conseil des
biotechnologies
à l'attention de Monsieur Hamid Ouahioune
3 place de Fontenoy
75007 PARIS

16 SEP. 2011

Paris, le

Objet : saisine du Haut conseil des biotechnologies sur un dossier de demande de mise sur le marché d'OGM

Références : 110915-saisine HCB- dossier 2011-91

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 58 25 fax : 01 49 55 59 49

courriel : anne.grevet@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Président,

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). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'AESA, le dossier est mis à disposition des États membres qui disposent de 3 mois pour faire des commentaires.

Le dossier suivant a été déclaré valide par l'AESA et est soumis à consultation des États membres :

- dossier **EFSA-GMO-NL-2011-91**, concernant la mise sur le marché du soja génétiquement modifié **DAS-68416-4** pour l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'AESA jusqu'au 8 décembre 2011.

Dans cette perspective, j'ai l'honneur de vous demander, par la présente saisine, de bien vouloir procéder à une évaluation de ce dossier afin de proposer des commentaires à transmettre à l'AESA au plus tard le **5 décembre 2011**.

J'appelle votre attention sur le fait que le dossier contient des informations que le pétitionnaire souhaite maintenir confidentielles.

Je vous prie de croire, Monsieur le Président, à l'assurance de ma considération distinguée.

L'ingénieur
Sous-Directeur

des Forêts
des Végétaux

Robert TESSIER

Annexe 2 : Elaboration des commentaires

Ces commentaires ont été élaborés par le CS du HCB, composé de :

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

et par ordre alphabétique des noms de famille : Claude Bagnis, Yves Bertheau, Pascal Boireau, Denis Bourguet, François-Christophe Coléno, Denis Couvet, Jean-Luc Darlix, Elie Dassa, Maryse Deguergue, Marion Desquilbet, Hubert de Verneuil, Robert Drillien, Anne Dubart-Kupperchmitt, Nathalie Eychenne, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Mireille Jacquemond, André Justin, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Jane Lecomte, Olivier Le Gall, Didier Lereclus, Rémy Maximilien, Antoine Messéan, Nicolas Munier-Jolain, Jacques Pagès, Daniel Parzy, Catherine Regnault-Roger, Pierre Rougé, Patrick Saindrenan, Annie Sasco, Pascal Simonet, Virginie Tournay, Bernard Vaissière, Jean-Luc Vilotte.

Participant à l'élaboration de l'avis de l'AESA en tant que membre du panel OGM de l'AESA, Antoine Messéan n'a contribué ni à l'élaboration ni à la rédaction de ces commentaires.

Aucun des autres membres du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec sa réponse à la consultation.

Annexe 3 : Commentaires traduits en anglais à destination de l'AESA

Cette annexe est une compilation des commentaires du HCB sur le dossier EFSA-GMO-NL-2011-91 traduits en anglais à destination de l'AESA, prêts à être postés en ligne de manière indépendante par section dans les formulaires du site de l'AESA.

A3.1. General comments

1. The Scientific committee of the High Council for biotechnologies requests that a repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents be conducted for the assessment of soybean meal in accordance with OECD guidelines.
2. The comparison tests performed in the dossier only enable to determine whether the differences observed are statistically significant. Neither power analysis nor equivalence testing is proposed. The EFSA guidelines for compositional analysis (EFSA, 2010) are not implemented. The conclusions on substantial equivalence of DAS-68416-4 to its non-GM comparators are therefore not justified.
3. As a whole, the EFSA-GMO-NL-2011-91 notification for the import, processing, food and feed use of DAS-68416-4 soybean in Europe only refers to import destinations in the European Union regions with temperate climate. The notifier should systematically consider, in his risk assessment analysis as well as in his monitoring plans, that the European Union also includes territories in tropical zones that are suitable for the cultivation and survival of soybean. It is the case for some of the French overseas territories like French Guiana.

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.

A3.2. Comments per section

B. INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL PLANTS

4. Dissemination

(a) ways and extent of dissemination

Most studies referred to in the notification dossier are based on data from the American continent. Soybean pollinators in the European Union were not analysed, neither the specific characteristics of the soybean varieties concerned. This analysis should be required considering that the rate of self-pollination depends on the level of cleistogamy of a variety.

In addition, soybean flowers produce nectar (Erickson and Garment, 1979), and they are effectively visited by Western honey bees (*Apis mellifera*) throughout the world [Brésil (Chiari et al., 2005), Chine (Chiang and Kiang, 1987), Etats-Unis (Abrams et al., 1978; Erickson et al., 1978; Mason, 1979)]. Abundant and diversified wild bees also exist that visit soybean flowers (Rust et al., 1980). In particular, the leafcutter bee *Megachile rotundata*, an abundant species in the South of France originating from South Europe, is an effective soybean pollinator (Ortiz-Perez et al., 2006; Roumet and Magnier, 1993), as is the Western honey bee (Koelling et al., 1981). In this context, very low self-pollinating rates as measured in the field in Brazil (Abud et al., 2007) and in the United States (Ray et al., 2003) are not indicative of very low self-pollinating rates in France. Self-pollinating rates and the distance of pollen dispersal likely vary with the specific pollinators of a cultivation area.

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.

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.

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.

Koelling, P.D., Kenworthy, W.J., and Caron, D.M. (1981). Pollination of male-sterile soybeans in caged plots. *Crop Sci* 21, 559-561.

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).

Ortiz-Perez, E., Horner, H.T., Hanlin, S.J., and Palmer, R.G. (2006). Insect-mediated seed-set evaluation of 21 soybean lines segregating for male sterility at 10 different loci. *Euphytica* 152, 351-360.

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.

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.

(b) special factors affecting dissemination, if any

This section, which only refers to section B4, should be better developed.

5. Geographical distribution and cultivation of the plant, including the distribution in Europe of the compatible species

The Scientific committee of HCB acknowledges that there are no wild species (*Glycine soja*) related to cultivated soybean varieties [*Glycine max* (L.) Merr] in "continental" Europe. However, the notification should consider the case of some EU overseas territories that are suitable for soybean cultivation and survival, and indicate whether any species related to soybean could be found there in conjunction with a potential cultivation of soybean.

D. INFORMATION RELATING TO THE GM PLANT

6. Any change to the ability of the GM plant to transfer genetic material to other organisms

(a) Plant to bacteria gene transfer

The arguments presented by the notifier (p. 64-65) are over-all acceptable as written. It is worth precisising, however, that the likeliest mechanism of plant to bacteria gene transfer is bacterial transformation. Despite a lack of evidence in the field, gene transfer was demonstrated in laboratory conditions close to environmental conditions, showing that there is no reason to exclude plant to bacteria gene transfer events in nature. In fact, experiments conducted in the laboratory and in the glasshouse on model systems composed of various transgenic plants and a few naturally transformable bacteria as recipient bacteria

demonstrated that gene transfer to environmental bacteria is likely to occur at frequencies high enough to allow detection (Gebhard and Smalla, 1998; Kay et al., 2002; Pontiroli et al., 2009; Rizzi et al., 2008). The occurrence of gene transfer at significant hence detectable frequencies is limited to prokaryotic sequences, which may integrate in the bacteria and possibly Archaeae genomes via homologous or homeologous recombination in the regions of high nucleotide homology. It is absolutely impossible, however, to provide frequencies of gene transfer, as the notifier does.

In the field, it is impossible to detect these gene transfer events because of the lack of sensitivity and specificity of the current detection methods, especially due to the natural presence, in large quantities, of the same genes in the genomes of soil bacteria.

The transgenic sequences of DAS-68416-4 soybean originate from *Delftia acidovorans* (or *Comamonas acidovorans*), which belongs to the order of *Pseudomonadales* and the family of *Pseudomonadaceae*, very common bacteria throughout different types of environments (soils, sediments, activated sludge, etc.). *Streptomyces viridochromogene* is a common bacteria of the soil. Therefore, the transgenic sequences of DAS-68416-4 soybean belong to DNA sequences that may be transferred to bacteria at higher frequencies than the other genes of the plant. This characteristic implies two contrasted properties with respect to gene transfer:

1. The high occurrence in the soil of the bacteria from which these genes originate first implies that many bacteria will contain DNA sequences entirely homologous to the transgenes, onto which homologous recombination could be primed and result into gene transfer. In most cases, this transfer event would consist in the replacement of an indigenous copy of the bacterial gene with a copy coming from the transgenic plant, without any notable consequences on expression. If the genes were transferred with their promoter and terminator sequences (of plant origin), they could not be expressed in a prokaryotic context, and the transferred segments would represent a genetic burden prone to counter-selection. As far as the symbiotic nitrogen-fixing root nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* is concerned, the probability of transfer is extremely low considering the bacteria is not naturally transformable.
2. The high occurrence in the soil of bacteria containing sequences homologous to the transgenes also implies that a potential bacterial acquisition of a functional copy of a transgene is unlikely to modify the structure of the soil bacteria community, which contains many bacteria naturally carrying the same gene (which can be exchanged by horizontal transfer between different bacteria of the community).

The notifier's comment on transfer to human cells is relatively out of context. The question at stake up to this point was a transfer to environmental bacteria. Gene transfer to human cells is even less likely to occur. Studies were performed to determine whether bacteria (in particular pathogenic bacteria) could act as vectors for gene therapy. A transfer mechanism requiring a primary transfer from plant to environmental bacteria, then to human cells could only occur at extremely low frequency, down to infinitesimal probabilities. A direct transfer from plant to human cells is also excluded, extracellular DNA being subject to highly significant degradation.

The SC of HCB agrees with the notifier's conclusion on the natural presence of these transgenes in the environment, and on the lack of risk associated with a potential horizontal transfer of these transgenes.

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

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.

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.

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.

(b) Plant to plant gene transfer

The notification dossier provides quasi none of the data available in the literature on the levels of soybean cross-pollination, and nothing is said about pollinators.

The Brazilian study from Abud and colleagues (2007) performed to determine pollen dispersal from transgenic to nontransgenic soybean under field conditions should be mentioned. It shows the greatest amount of transgenic pollen dispersion in the first row, located at one meter from the central (transgenic) plot, with a 0.52% average frequency. The frequency of pollen dispersion decreases to 0.12% in the next row, reaching 0% at 10 m from the source. Moreover, it is likely that cross-pollination rates will vary with pollinators. Soybean flowers produce nectar (Erickson and Garment, 1979), and they are effectively visited by Western honey bees (*Apis mellifera*) throughout the world [Brésil (Chiari et al., 2005), Chine (Chiang and Kiang, 1987), Etats-Unis (Abrams et al., 1978; Erickson et al., 1978; Mason, 1979)]. Abundant and diversified wild bees also exist that visit soybean flowers (Rust et al., 1980). In particular, the leafcutter bee *Megachile rotundata*, an abundant species in the South of France originating from South Europe, is an effective soybean pollinator (Ortiz-Perez et al., 2006; Roumet and Magnier, 1993), as is the Western honey bee (Koelling et al., 1981).

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.

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.

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.

Koelling, P.D., Kenworthy, W.J., and Caron, D.M. (1981). Pollination of male-sterile soybeans in caged plots. *Crop Sci* 21, 559-561.

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).

Ortiz-Perez, E., Horner, H.T., Hanlin, S.J., and Palmer, R.G. (2006). Insect-mediated seed-set evaluation of 21 soybean lines segregating for male sterility at 10 different loci. *Euphytica* 152, 351-360.

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.

7. Information on any toxic, allergenic or other harmful effects on human or animal health arising from the GM food/feed

7.3 Selection of material and compounds for analysis

Most mean values measured in the different locations for DAS-68416-4 soybean, whether sprayed or not with herbicides, and the control soybean, were within literature and reference ranges for soybean. A limited number of significant differences were observed due to the different herbicide treatments, but they were considered not meaningful in terms of

composition because the results were within ranges found for commercial soybean. The applicant concludes (p. 102) :

"unsprayed DAS-68416-4 soybean, DAS-68416-4 soybean + 2,4-D, DAS-68416-4 soybean + glufosinate, and DAS-68416-4 soybean + both soybean composition results confirm equivalence of DAS-68416-4 soybean (Event DAS-68416-4) soybean to conventional soybean lines."

The Scientific committee of HCB stresses that the comparison tests performed by the notifier only enable to determine whether the differences observed are statistically significant. A power analysis is required to conclude on the absence of biologically meaningful differences, and equivalence testing should be performed to conclude on substantial equivalence.

7.7 Anticipated intake/extent of use

The notifier indicates (p. 108-109) :

" the anticipated uses of DAS-68416-4 soybean and derived food and feed products will be no different from those corresponding to commercial. In the EU, the majority of soybean products, either from imports or cultivation, are fed to livestock. Today, there are three major soybean commodity products: seeds, oil, and meal and there is animal feed use, and no food use for unprocessed soybeans, since they contain anti-nutrient factors, such as trypsin inhibitors and lectins. Considering that the high temperatures used processing degrades the proteins as shown in section 7.8, we anticipate negligible amounts of proteins being present in products derived from DAS-68416-4 soybean."

The Scientific committee of HCB has two comments on this statement :

1. The dossier indicates that all soybean transformation processes for food involve high temperatures. Elements should be provided to strengthen this statement.
2. The dossier presents a study on the effect of heat treatment on AAD-12 (Schafer, 2010), which shows that heating during 30 minutes at 50, 70 and 95°C eliminates its enzymatic activity and 99% of its immunoreactivity. However, the SC of HCB notes that the effects of heat treatment on the PAT protein are not mentioned and asks that this be completed.

The notifier also mentions that (p. 109) :

"Whilst DAS-68416-4 soybean also expresses the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein, our dietary risk assessment does not focus further on it, because the PAT protein is a safe protein for humans, animals and the environment that is well-understood and risk assessed, with a long list and history of regulatory approvals. Hence, this report presents a summary of the dietary exposure assessment for the AAD-12 protein from DAS-68416-4 soybean for humans and livestock (Cleveland, 2010)."

Based on this statement, the SC of HCB would have expected that these PAT data be clearly presented in the dossier, with the corresponding references, especially for the data approved by regulatory instances. The dossier is inconsistent on this issue : some elements of PAT risk assessment are reported in quite some details (allergenicity, biochemical characterisation, etc.) whereas others are partial and lack verifiable references (see section 7.8 on toxicity studies)

Schafer, B.W. (2010). Summary of the effect of heat treatment on a recombinant aryloxyalkanoate dioxygenase-12 protein. In Dow AgroSciences LLC Laboratory study ID: 101047 (Indianapolis, Dow AgroSciences LLC).

7.8 Toxicology

7.8.1 Safety assessment of newly expressed proteins

The safety assessment of the protein AAD-12 was conducted in a relative exhaustive way, with a part on biochemical characterisation (identity, mode of action, enzymatic specificity, thermal stability, equivalence of microbially-derived AAD-12 and DAS-68416-4 soybean expressed protein, glycosylation, etc.).

The dossier includes an acute oral toxicity study in mice, and a 28-days repeat dose study in mice (p. 126-127). The Scientific committee of HCB notes that the latter study (Thomas et al., 2010) followed good laboratory practices in accordance with international guidelines, and included thorough examinations of the health state of the animals (notably including biochemical and hematological analyses, as well as anatomopathological examinations).

Despite the mention in section 7.7 that PAT data were deliberately excluded from the dossier because of their long-standing validation by regulatory instances, a paragraph focuses on the toxicity of this protein for mammals, and mentions only an acute oral toxicity study in mice. It is unclear whether this acute oral toxicity study, referred to as “Brooks et al., 2000”, a study which is missing from the references and the appendices of the dossier, is the one validated by regulatory instances. Furthermore, no mention is made of long-term toxicity.

Thomas, J., Brooks, K.S., and Sura, R. (2010). 28 dietary toxicity study in CRL:CD1(ICR) mice. In Dow AgroSciences LLC Laboratory study ID: 091024 (Indianapolis).

7.8.4 Testing of the whole GM food/feed

The Scientific committee of HCB asks that a repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents be conducted in accordance with OECD guidelines (OECD, 1998) for the assessment of soybean meal to evaluate the toxicity of the combination of both proteins in the context of a whole plant.

OECD (1998). OECD guideline for the testing of chemicals - Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. n°408.

7.10 Nutritional assessment of GM food/feed

7.10.1 Nutritional assessment of GM food

The notifier invokes a compositional and nutritional equivalence of DAS-68416-4 soybean with its non GM comparator to estimate that food products derived from DAS-68416-4 soybean are nutritionally equivalent to food products derived from commercial soybean.

The SC of HCB stresses again that the statistical tests performed in the dossier only enable to conclude on the absence of statistically significant differences. Equivalence testing should be performed to conclude on compositional or nutritional equivalence of the GM and non GM soybean. This criticism aside, the notifier’s conclusion on the nutritional assessment of DAS-68416-4 soybean as food seems legitimate.

7.10.2 Nutritional assessment of GM feed

A 42-day study was conducted on 120 chickens (12 replicates of 10 birds each) distributed in 3 lots corresponding to 3 diets prepared with either transgenic DAS-68416-4 soybean meal, non-transgenic near-isogenic soybean meal or meal made from non-transgenic standard commercially available soybeans). Effects on mortality and weight gain, feed conversion efficiencies, and other health and performance parameters were determined at the end of each phase (starter, grower and finisher) and at the end of the experiment.

No statistically significant differences occurred between broilers fed GM soybean and those fed the near-isogenic non-GM soybean, except for daily feed intake for male birds (3.7% less for male birds fed diets containing DAS-68416-4 versus non-GM near-isogenic soybean meal), but this did not occur for females and was not manifested in any significant change in performance for the male birds. A few statistically significant differences were seen in the data

set of the three commercial diets containing non-GM versus DAS-68416-4 soybean meal, but those differences were not seen consistently in all of the commercial soybean meal diets (LG C3540, Pioneer 93B82 et HiSoy 38C60).

The SC of HCB points out that false-positives are expected in a context of multiple comparisons (5% under the null hypothesis). Techniques such as FDR (False Discovery Rate) can be implemented to take into account the multiplicity of the tests and to control the number of false positives.

The notifier concludes from this study (p. 142) :

"These results indicate that DAS-68416-4 soybean is nutritionally equivalent to the non-transgenic near-isogenic control."

The SC of HCB stresses again that the statistical tests performed in the dossier only enable to conclude on the absence of statistically significant differences. A power analysis should be conducted to enable to conclude on the absence of biologically significant differences, and equivalence testing should be performed to enable to conclude on the nutritional equivalence of DAS-68416-4 soybean with its non GM soybean comparator.

9. Potential changes in the interactions of the GM plant with the biotic environment resulting from the genetic modification

9.1 Persistence and invasiveness

p. 146 :

"Based on centuries of experience with conventional, domesticated soybean in Europe, there is no potential for soybean to be invasive of natural habitats or persist in the agricultural environment without the aid of human intervention. Soybean is a poor competitor, which outside of cultivation has no meaningful impact on biodiversity or the environment (OECD, 2000; Abel, 1970)."

Temperatures partly condition the occurrence of volunteers. Soybean being sensitive to cold temperatures, volunteers developed before winter following an incidental grain release during shipment and handling of imported lots will not survive the winter conditions commonly found in "continental" Europe. This statement will need revision in a context of climatic change. In addition, it does not apply to some overseas territories of the European Union (including some French ones) located in tropical conditions.

p. 147 :

"The advantage is of purely agronomic interest and presents negligible risk to the non-agricultural environments, because of the poor survival characteristics of soybean under most European conditions."

The selective advantage conferred to DAS-68416-4 soybean in the presence of 2,4-D and glufosinate-ammonium herbicides should be discussed in a context of herbicide treatment of the edges of the fields and of the roadsides. The presence of soybean volunteers out of the fields is little documented, but herbicide treatment (in particular glufosinate) is commonly used to manage the edges of the fields and the roadsides in France.

9.2 Selective advantage or disadvantage

The selective advantage conferred to DAS-68416-4 soybean in the presence of 2,4-D and glufosinate-ammonium herbicides should be discussed in a context of herbicide treatment of the edges of the fields and the roadsides.

9.3 Potential for gene transfer

The notifier is requested to extend his analysis to EU overseas territories.

11. Environmental Monitoring Plan

11.4 General surveillance for unanticipated adverse effects

As for the environmental risk assessment, the post-marketing monitoring plans should consider the tropical conditions suitable for the cultivation and survival of soybean that may be found in some EU overseas territories.