
COMITÉ SCIENTIFIQUE

AVIS

en réponse à la saisine du HCB
sur le dossier EFSA-GMO-NL-2018-153 ¹.

Paris, le 24 mai 2019

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 15 mars 2019 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation) d'une demande d'avis relative au dossier **EFSA-GMO-NL-2018-153** de demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié **GMB151** à des fins d'importation, transformation, alimentation humaine et animale.

Ce dossier a été déposé par la société BASF Agricultural Solutions Seed US LLC auprès de la Commission européenne sur le fondement du **règlement (CE) n° 1829/2003**. L'évaluation des dossiers de demande de mise sur le marché est confiée à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Les Etats membres disposent de trois mois pour envoyer leurs commentaires à l'EFSA en contribution à l'évaluation du dossier.

Dans ce contexte, le HCB est invité à proposer des commentaires à destination de l'EFSA au plus tard le 3 juin 2019.

Le Comité scientifique (CS)² du HCB a examiné le dossier en séance du 16 mai 2019 sous la présidence de Jean-Christophe Pagès. Le présent avis a été adopté le 24 mai 2019, transmis aux autorités compétentes le 31 mai 2019 et publié le 19 juin 2019.

¹ La saisine du HCB sur le dossier EFSA-GMO-NL-2018-153 est reproduite dans l'Annexe 1.

² Les modalités de l'élaboration de l'avis et la composition du CS sont indiquées dans l'Annexe 2.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	3
1.1. CONTEXTE REGLEMENTAIRE DE LA SAISINE	3
1.2. HISTORIQUE DU DOSSIER	4
1.3. PRESENTATION DE LA PLANTE GENETIQUEMENT MODIFIEE.....	4
2. COMMENTAIRES A DESTINATION DE L'EFSA	5
2.1. REMARQUES GENERALES	5
2.2. COMMENTAIRES PAR SECTIONS DEFINIES PAR L'EFSA POUR LES COMMENTAIRES	7
3. BIBLIOGRAPHIE.....	13
ANNEXE 1 : SAISINE	15
ANNEXE 2 : ELABORATION DE L'AVIS.....	16
ANNEXE 3 : COMMENTAIRES TRADUITS EN ANGLAIS A DESTINATION DE L'EFSA	17
A2.1. GENERAL COMMENTS.....	17
A2.2. COMMENTS PER SECTION.....	19

1. Introduction

1.1. Contexte réglementaire de la saisine

Le Haut Conseil des biotechnologies (HCB) a été saisi le 15 mars 2019 par les autorités compétentes françaises (le ministère de l'Agriculture et de l'alimentation) d'une demande d'avis relative à une évaluation du dossier EFSA-GMO-NL-2018-153, portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché du soja génétiquement modifié GMB151. Le dossier a été déposé par la société BASF Agricultural Solutions Seed US LLC auprès de la Commission Européenne sur le fondement du règlement (CE) n° 1829/2003³.

Sur le fondement du règlement (CE) n° 1829/2003, l'évaluation des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées est centralisée par l'EFSA⁴, qui dispose d'un délai de 6 mois, à compter de la date de validation du dossier, pour transmettre son avis à la Commission européenne.

En parallèle, les Etats membres disposent d'un délai ferme de trois mois pour envoyer leurs commentaires à l'EFSA en contribution à l'évaluation sanitaire et environnementale du dossier. En France, les autorités compétentes saisissent d'une part l'Anses (l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), pour réaliser l'évaluation sanitaire du dossier, et d'autre part le HCB, pour réaliser l'évaluation environnementale associée à un risque de dissémination de l'OGM. En l'absence d'un tel risque (par exemple, dans le cas d'une mise sur le marché de produits dérivés d'OGM comme des tourteaux de soja), seule l'Anses est saisie. La France couvre ainsi les deux pans de l'évaluation réalisée par l'EFSA.

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

Les groupes de travail de l'EFSA 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'EFSA. Les commentaires de chaque Etat membre, ainsi que les réponses correspondantes de l'EFSA, sont rendus publics, en annexe de l'avis scientifique de l'EFSA à destination de la Commission européenne.

La procédure de transmission des commentaires à l'EFSA 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 explicitées dans le document d'orientation de l'EFSA relatif à la soumission de dossiers de demande de d'autorisation de mise sur le marché de plantes génétiquement modifiées à des fins alimentaires (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2015). Ces commentaires doivent être

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 pour animaux 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 EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments, traduction de *European Food Safety Authority*.

⁵ OGM : organisme génétiquement modifié.

ciblés sur des demandes spécifiques adressées à l'EFSA, 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 avis scientifique.

C'est dans ce cadre que le HCB a été saisi. L'objectif de cet avis du HCB est donc de contribuer à l'évaluation environnementale du dossier par l'EFSA.

En fin d'évaluation, la Commission européenne soumettra au vote des Etats membres un projet de décision concernant l'autorisation de mise sur le marché du soja GMB151 dans l'Union européenne, élaboré sur la base de l'avis de l'EFSA. Le HCB pourra à nouveau être saisi par les autorités compétentes françaises pour qu'il puisse réviser son évaluation selon les informations supplémentaires versées au dossier depuis son évaluation initiale. A ce stade ultérieur, le HCB rédigera un avis fournissant un éclairage complet sur le dossier à destination du Gouvernement.

1.2. Historique du dossier

L'EFSA a reçu le dossier EFSA-GMO-NL-2018-153 des autorités compétentes espagnoles le 9 octobre 2018 et, après vérification de sa conformité réglementaire, l'a validé le 4 mars 2019 et soumis à consultation des Etats membres jusqu'au 8 juin 2019.

1.3. Présentation de la plante génétiquement modifiée

Le soja (*Glycine max*) GMB151 (BASF Agricultural Solutions Seed US LLC) a été modifié génétiquement par introduction de deux gènes : *cry14Ab-1* de *Bacillus thuringiensis*, qui confère une toxicité envers le nématode à kyste du soja, *Heterodera glycines*, et *hppdPf-4Pa* codant une version mutée de l'enzyme 4-hydroxyphényl-pyruvate dioxygénase (4-HPPD) de *Pseudomonas fluorescens*, qui lui confère une tolérance envers les herbicides de la famille des inhibiteurs de la 4-hydroxyphényl-pyruvate dioxygénase.

L'événement GMB811 a été obtenu par transformation génétique avec la souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contenant les gènes *cry14Ab-1* et *hppdPf-4Pa* au sein de l'ADN-T du plasmide binaire pSZ8832. L'événement GMB151 correspond à l'insertion d'une copie des deux cassettes d'expression, en un locus unique, situé sur le chromosome 7 du soja. Les analyses bioinformatiques indiquent que l'ADN-T s'est inséré dans la séquence de terminaison 3' d'un gène putatif codant une protéine « BON1-associated protein 1-like » (BAP1). A l'exception de l'ADN-T et de la présence en 3' de l'ADN-T de 21 pb identiques à celles de la séquence ORIpVS1 du plasmide de transformation pSZ8832, aucune autre partie du vecteur de transformation n'a été transférée dans le génome du soja GMB151. L'expression des transgènes *cry14Ab-1* et *hppdPf-4Pa* dans les plantes n'est pas modifiée par un traitement avec l'herbicide isoxaflutole. La stabilité génétique et phénotypique du soja GMB151 a été vérifiée sur 5 générations. L'étude de la descendance en ségrégation est en accord avec une hérédité mendélienne d'un locus unique.

- Transgènes et fonctions :

La protéine Cry14Ab-1 produite par *B. thuringiensis* appartient au groupe des delta-endotoxines. Identifiée en laboratoire en raison de son impact sur le nématode *Caenorhabditis elegans*, la protéine Cry14Ab-1 est également active contre le nématode à kyste du soja (NKS), *Heterodera glycines*. Lors d'expériences réalisées avec *C. elegans*, il a été montré que Cry14Ab-1 détruit l'intestin du nématode (Annexe 16-RSKI077, p. 10). *H. glycines* est considéré comme étant l'un des parasites les plus ravageurs pour le soja, la terre étant le vecteur principal pour sa

propagation. Après infection des racines, le nématode détourne les éléments nutritifs circulant dans le système vasculaire des plantes à son profit. Les symptômes d'une infestation par le nématode à kyste du soja comprennent notamment le rabougrissement des plants, la chlorose des feuilles, la réduction de la nodulation par *Rhizobium* et la sénescence précoce des plants (Niblack, 2005). Les pertes de production liées à ce nématode sont estimées entre 25% et 38% dans 28 états américains.

La 4-hydroxyphényl-pyruvate dioxygénase participe au catabolisme de la tyrosine. Dans les plantes, elle permet la formation d'homogentisate (HGA), un précurseur des plastoquinones et des tocophérols essentiels à la production de caroténoïdes, et donc à la photosynthèse (Siehl et al., 2014). La famille des inhibiteurs de l'HPPD (groupe HRAC F2) comprend 4 molécules herbicides autorisées en France, (isoxaflutole, mésotrione, sulcotrione, tembotrione – Index ACTA, 2018) pour une dizaine d'autres molécules autorisées dans le reste du monde. En France, ces herbicides sont utilisés seuls ou en mélange, principalement sur le maïs et la canne à sucre. La version mutée de la protéine 4-HPPD, appelée HPPDPf-4Pa, résulte de quatre substitutions d'acides aminés qui permettent le maintien de l'activité enzymatique 4-HPPD en présence des herbicides concernés.

2. Commentaires à destination de l'EFSA

2.1. Remarques générales

Remarques principales :

Concernant l'analyse moléculaire :

- L'impact éventuel de l'insertion sur le niveau d'expression de ce gène dans le soja GMB151 n'a pas été recherché. Le CS du HCB suggère qu'une analyse de l'expression soit réalisée afin de vérifier que l'insertion n'a pas d'impact sur l'expression du gène putatif *BAP1* codant une protéine « BON1-associated protein 1-like ».
- Dans l'annexe concernant la validation des méthodes Elisa (STSa-DD0101-01, p. 4), le pétitionnaire indique l'existence de deux lots différents de protéines Cry34Ab-1 utilisés comme standards, à savoir les lots 1506_Cry14Ab-1 et 1514_Cry14Ab-1. Le CS du HCB demande que le pétitionnaire confirme l'utilisation du seul lot 1514_Cry14Ab-1 pour l'ensemble des dosages réalisés ou bien de préciser si ces deux lots 1506_Cry14Ab-1 et 1514_Cry14Ab-1 sont équivalents.

Concernant l'analyse comparative :

- Concernant les essais terrain, Le CS demande à ce que le traitement de désherbage conventionnel soit précisé (CHM : Conventional Herbicide Management) dans le dossier.
- Concernant les analyses statistiques relatives à l'analyse comparative, le CS du HCB demande à ce que la justification des différences significatives soit revue par le pétitionnaire. (Main text, p71 : "*the equivalence test was not valid due to estimated genotypic variance of 0 for the reference varieties; therefore, the differences were considered to be of no biological relevance*"). Le CS du HCB demande au pétitionnaire d'adapter la méthodologie des tests si les conditions d'application ne sont pas remplies.

Concernant l'évaluation des risques pour l'environnement

- Le CS du HCB demande à ce que des informations complémentaires (expérimentales ou issues de la bibliographie) soient apportées dans le dossier afin de préciser le risque de persistance dans l'environnement à partir de semences accidentellement dispersées, en particulier pour les conditions climatiques des DROM-COM.

- Les risques de dissémination pollinique et de croisement avec des espèces apparentées, bien que limités en France métropolitaine et en Europe continentale, ne sont pas pris en compte dans les DROM-COM. Le CS du HCB souhaite que les caractéristiques environnementales particulières des DROM-COM soient considérées dans l'évaluation des risques.

- Concernant les interactions du soja GMB151 avec les organismes cibles, le CS du HCB souligne que des résistances sont couramment observées vis-à-vis de cette stratégie « Cry » nématocide, et que la mise en culture de plantes qui ne combinerait pas différentes toxines ciblant les mêmes ravageurs par le biais de différents modes d'action, présente un risque non négligeable d'évolution de la résistance aux toxines Cry chez les ravageurs cibles, nécessitant la mise en place de stratégies appropriées de gestion de la résistance et la mise en œuvre d'un plan de surveillance spécifique de l'évolution de la résistance.

- Concernant les interactions du soja GMB151 avec les organismes non-cibles, le dossier traite de l'installation de populations férales et de la consommation de déjections, mais pas de la consommation de matériel végétal importé. Le CS du HCB demande à ce que ce point soit traité dans le dossier.

Si la littérature concernant la toxine Cry14Ab-1 est quasi-inexistante dans le dossier, il est à noter que cette protéine a montré une activité nématocide en bio-essais *in vitro* sur *Caenorhabditis elegans*. Il a également été décrit dans un brevet que la protéine Cry14 était active sur des larves de coléoptères *Diabrotica virgifera* (Payne, J. and Narva, K., 1994, Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079). Cette information a été reprise dans certaines revues plus récentes (de Maagd *et al.*, 2001 ; van Frankenhuyzen, 2009). Cependant, les résultats présentés dans le dossier indiquent une absence totale d'activité de Cry14Ab-1 contre ce coléoptère (Annexe M-573850-01-1). Le CS du HCB demande à ce que ce point soit discuté et développé dans le dossier.

Le CS du HCB demande notamment au pétitionnaire d'évaluer la toxicité de Cry14Ab-1 vis-à-vis d'autres coléoptères, dont font partie nombre de ravageurs des stocks. Ceci permettrait de statuer sur l'existence d'un éventuel risque de développement de résistance à Cry14Ab-1 chez ces organismes, les graines et les cosses de soja GMB 151 présentant des quantités mesurables de toxine Cry14Ab-1 dans la matière sèche (de l'ordre de 85 µg/g_{BS} dans les grains et 25 µg/g_{BS} dans les cosses ; tableau 1.3.14).

Enfin, on peut noter que certaines protéines Cry appartenant au groupe des toxines nématocides avaient été mentionnées comme actives vis-à-vis d'hyménoptères (de Maagd *et al.*, 2001). Le CS du HCB considère que ce point mériterait également d'être développé.

Dans le cas de l'exposition d'organismes non-cibles *via* des déjections animales, le document « Main text » conclut également que les conséquences écologiques seraient limitées du fait des faibles quantités de protéines retrouvées dans les déjections animales. Cependant, le pétitionnaire ne présente pas de données quant aux concentrations de toxine Cry14Ab-1

contenues dans les fèces d'animaux ayant consommé des produits issus de soja GBM 151. Le CS du HCB demande que ce point soit développé par le pétitionnaire et que ce risque d'exposition des organismes non-cibles à la toxine Cry14Ab-1 contenue dans les fèces d'animaux ayant consommé des produits issus de soja GBM 151 soit pris en considération.

Concernant les rapports de surveillance et le plan de surveillance post-commercialisation :

- Le CS du HCB demande au pétitionnaire de se rapprocher des Autorités compétentes en charge de la biosurveillance dans les Etats membres, afin d'harmoniser avec elles, et sous leur contrôle, les démarches de surveillance à réaliser s'il existe un contexte spécifique existant dans un Etat membre. Le CS du HCB rappelle que ce contexte spécifique existe dans des zones où le climat permet l'existence de populations férales issues de ce soja (en France, dans certains DROM-COM).

Remarques supplémentaires :

- Le CS du HCB note que l'Union européenne a ratifié la Convention sur la diversité biologique, qui indique que les pays exportateurs comme importateurs ont des responsabilités internationales en matière de diversité biologique.

Dans ce cadre, certains membres du CS du HCB soulignent qu'il importe de prendre en compte dans ses décisions l'impact de la culture du soja GMB151 dans les pays tiers exportateurs, sur la biodiversité dans l'Union européenne. Dans cette perspective, et considérant que la diversité biologique des pays importateurs et exportateurs est liée, ils souhaiteraient que le dossier fasse état des données existantes concernant l'impact de cette culture sur la biodiversité des pays producteurs exportateurs.

De plus, ils recommandent que le régulateur prenne en compte dans ses décisions l'influence de l'importation de certains produits, qu'ils soient transgéniques ou non, sur le choix des cultures en Europe, et sur la biodiversité résultant des agrosystèmes associés.

- D'un point de vue agronomique, les herbicides inhibiteurs de l'HPPD, sont concernés par des phénomènes d'évolution de résistance chez les populations de plantes adventices visées (weedsience.org). L'autorisation de mise sur le marché du soja GMB151 pouvant entraîner un usage accru de ces herbicides, elle pourrait contribuer à la sélection de nouvelles populations résistantes, et possiblement de populations présentant des résistances multiples à plusieurs herbicides. La possibilité que ces populations résistantes se disséminent en dehors des zones de cultures du soja GMB151, n'est pas à exclure. Le CS du HCB souligne que la culture du soja GMB151 pourrait donc entraîner des conséquences négatives d'un point de vue agronomique aussi bien dans les pays producteurs que dans les pays tiers.

2.2. Commentaires par sections définies par l'EFSA pour les commentaires

N.B. : Les titres soulignés correspondent aux sections réglementaires du dossier et aux différents formulaires mis à disposition par l'EFSA 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.

1.2. Molecular Characterisation

- Les analyses bioinformatiques indiquent une intégration de l'ADN-T dans le chromosome 7 du soja (utilisation du génome de référence du cultivar de soja Williams 82 (Schmutz et al., 2010)). L'insertion est localisée dans la séquence 3' d'un gène putatif *BAP1* codant une protéine « BON1-associated protein 1-like » (BAP1). BAP1 est une protéine d'attachement aux phospholipides (« phospholipid-binding protein ») caractérisée par un domaine C2 d'adressage dans les membranes cellulaires. Des caractérisations fonctionnelles de gène *BAP-1* ont été effectuées chez *Arabidopsis thaliana* (Hua et al., 2001 ; Yang et al., 2007) et la vigne (Hou et al., 2018). L'expression du gène *BAP1* est induite par de multiples stress biotiques et abiotiques (blessure, stress oxydatif, stress au froid). Les résultats indiquent que BAP1 est un inhibiteur de la mort cellulaire programmée (Yang et al., 2007).

Cependant, l'impact éventuel de l'insertion sur le niveau d'expression de ce gène dans le soja GMB151 n'a pas été recherché. Le CS du HCB suggère qu'une analyse de l'expression soit réalisée afin de vérifier que l'insertion n'a pas d'impact sur l'expression du gène putatif *BAP1* codant une protéine « BON1-associated protein 1-like ». En effet, une diminution de l'expression de *BAP1* pourrait contribuer à une plus grande sensibilité des plantes aux attaques par des pathogènes et des périodes de stress, en particulier au froid.

- Dans l'annexe concernant la validation des méthodes Elisa (STSa-DD0101-01, p. 4), le pétitionnaire indique l'existence de deux lots différents de protéines Cry34Ab-1 utilisés comme standards, à savoir les lots 1506_Cry14Ab-1 et 1514_Cry14Ab-1. Dans le document 16-RSVLS015-A concernant les dosages Elisa dans les différents tissus, il est indiqué que le lot 1514_Cry14Ab-1 a été utilisé (16-RSVLS015-A, p. 11). Le CS du HCB demande que le pétitionnaire confirme l'utilisation du seul lot 1514_Cry14Ab-1 pour l'ensemble des dosages réalisés ou bien de préciser si ces deux lots 1506_Cry14Ab-1 et 1514_Cry14Ab-1 sont équivalents.

- Comme l'a souligné l'EFSA (2019-04-16 EFSA to appl_clock remains stopped 2_AP153_ANNEX.pdf), il n'a pas été tenu compte, dans les dosages ELISA effectués sur les échantillons, de l'efficacité d'extraction des protéines dans les différents tissus (STSaDD0101-01, p. 9). Le CS du HCB demande que les quantités de protéines Cry34Ab-1 et HPPD-4 indiquées dans l'Annexe 16-RSVLS015-A soient corrigées en tenant compte de ces facteurs.

1.3. Comparative analysis

1.3.2. Experimental design and statistical analysis of data from field trials for comparative analysis

- Concernant les essais terrain, il est précisé que toutes les variétés reçoivent le traitement de désherbage conventionnel (CHM : Conventional Herbicide Management) auquel s'ajoute le traitement à l'isoxaflutole à une dose d'environ 70,1 g/ha. Le CS demande à ce que le traitement de désherbage conventionnel soit précisé.

- Concernant les analyses statistiques relatives à l'analyse comparative, le CS du HCB demande à ce que la justification des différences significatives soit revue par le pétitionnaire. (Main text, p.71 : "*the equivalence test was not valid due to estimated genotypic variance of 0 for the reference varieties; therefore, the differences were considered to be of no biological relevance*"). Le CS du HCB demande au pétitionnaire d'adapter la méthodologie des tests si les conditions d'application ne sont pas remplies. Par exemple (p.71), une variance génotypique nulle pour les variétés de référence remet fortement en cause la pertinence du modèle choisi.

De plus, aucune correction ne semble avoir été faite pour les tests multiples, les seuils des tests sont donc très discutables.

1.3.5. Comparative analysis of agronomic and phenotypic characteristics

- Dans l'analyse des caractéristiques phénotypiques, concernant les résultats expérimentaux relatifs à la comparaison soja GMB151 avec des variétés de référence ayant subi un désherbage à l'isoxaflutole : les valeurs données dans le tableau 1.3.13 (p. 101, Main Text) sur la variable « Days to flowering » sont toutes identiques. Le CS du HCB demande à ce que ces valeurs du tableau soient vérifiées et corrigées si nécessaire.

5.3 Specific areas of risks

5.3.1 Persistence and invasiveness including plant-to-plant gene flow

Etablissement de plantes férales à partir de semences dispersées dans l'environnement

De manière générale, le dossier présente peu de données concernant la capacité germinative et la survie des graines.

Suite à une importation, la dissémination des transgènes par dispersion de graines et installation de repousses est très peu probable, pour les raisons suivantes :

- les conditions thermiques optimales de germination des graines de soja sont relativement élevées ;
- le soja fait partie des espèces d'origine tropicale sensibles au froid ;
- le développement des plantules nécessite une nutrition azotée adéquate, difficilement réalisable en l'absence de fumure azotée ou d'inoculum de *Bradyrhizobium japonicum*, bactérie apportée au semis en Europe continentale car absente de ces sols.

Le risque de repousses de soja ou d'installation de populations férales apparaît donc très faible en Europe continentale. Cependant, cette affirmation serait à nuancer dans certains DROM-COM où le climat est plus propice aux repousses de soja.

Par conséquent, le CS du HCB demande à ce que des informations complémentaires (expérimentales ou issues de la bibliographie) soient apportées afin de préciser le risque de persistance dans l'environnement à partir de semences accidentellement dispersées, en particulier pour les conditions climatiques des DROM-COM. Une alternative serait d'exclure ces territoires du périmètre de la commercialisation.

Croisement avec des espèces apparentées

Comme mentionné par le pétitionnaire, il n'existe pas d'espèces sauvages apparentées au genre *Glycine* sp. en Europe. Les risques de croisement semblent donc très limités en France métropolitaine et en Europe continentale. Cependant, le dossier ne prend pas en compte le risque de dissémination pollinique et de croisement avec des espèces apparentées dans les DROM-COM. Le CS du HCB souhaite que les caractéristiques environnementales particulières des DROM-COM soient considérées dans l'évaluation des risques (sont attendues notamment des informations actualisées sur l'aire de répartition des espèces du sous-genre Soja, auquel appartient *G. max* mais également *Glycine soja* et *Glycine gracilis*, espèces d'origine asiatiques respectivement sauvage et semi-sauvage voisines du soja cultivé, pour lesquelles des hybrides interspécifiques et fertiles ont été facilement obtenus). Une alternative serait d'exclure ces territoires du périmètre de la commercialisation.

5.3.3. Interactions between the GM plant and target organisms

Le CS du HCB souhaite souligner que l'état de l'art est particulièrement peu développé concernant la question spécifique des organismes cibles. Il manque beaucoup de références bibliographiques majeures dans le domaine.

De plus, des résistances sont couramment observées vis-à-vis de cette stratégie « Cry » nématocide. Le CS du HCB souligne en particulier que la mise en culture de plantes qui ne combindraient pas différentes toxines ciblant les mêmes ravageurs par le biais de différents modes d'action, présente un risque non négligeable d'évolution de la résistance aux toxines Cry chez les ravageurs cibles, nécessitant la mise en place de stratégies appropriées de gestion de la résistance et la mise en œuvre d'un plan de surveillance spécifique de l'évolution de la résistance.

5.3.4. Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

Considérant que la demande concerne l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale d'un organisme génétiquement modifié, l'exposition des organismes non-cibles peut se faire soit directement par l'installation de populations férales de plantes ou par la consommation par les organismes non-cibles de matériel végétal plus ou moins raffiné, soit indirectement, par la consommation de déjections animales, lorsque la plante est utilisée à des fins de nutrition animale.

Il est à noter que le dossier traite de l'installation de populations férales et de la consommation de déjections, mais pas de la consommation de matériel végétal importé. Le CS du HCB demande à ce que ce point soit traité dans le dossier. Compte tenu de la bibliographie, et de la non-spécificité d'action des protéines Cry sur les nématodes phytoparasites, ce soja en alimentation animale pourrait avoir une action sur les nématodes gastro-intestinaux des animaux d'élevage.

L'installation de populations férales de soja transgénique à partir de matériel biologique importé étant relativement faible en France, il est indiqué dans le dossier que le risque d'effet direct est minime. Cependant, ceci n'exclut pas un effet de la consommation de matériel végétal importé par des populations d'organismes non-cibles.

Si la littérature concernant la toxine Cry14Ab-1 est quasi-inexistante dans le dossier, il est à noter que cette protéine a montré une activité nématocide en bio-essais *in vitro* sur *Caenorhabditis elegans*. Il a également été décrit dans un brevet que la protéine Cry14 était active sur des larves de coléoptères *Diabrotica virgifera* (Payne, J. and Narva, K., 1994, Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079). Cette information a été reprise dans certaines revues plus récentes (de Maagd *et al.*, 2001 ; van Frankenhuyzen, 2009). Cependant, les résultats présentés dans le dossier indiquent une absence totale d'activité de Cry14Ab-1 contre ce coléoptère (Annexe M-573850-01-1). Le CS du HCB demande à ce que ce point soit discuté et développé dans le dossier.

Le CS du HCB demande notamment au pétitionnaire d'évaluer la toxicité de Cry14Ab-1 vis-à-vis d'autres coléoptères, dont font partie nombre de ravageurs des stocks. Ceci permettrait de statuer sur l'existence d'un éventuel risque de développement de résistance à Cry14Ab-1 chez ces organismes, les graines et les cosses de soja GMB 151 présentant des quantités mesurables de toxine Cry14Ab-1 dans la matière sèche (de l'ordre de 85µg/g_{BS} dans les grains et 25 µg/g_{BS} dans les cosses ; tableau 1.3.14).

Enfin, on peut noter que certaines protéines Cry appartenant au groupe des toxines nématocides avaient été mentionnées comme actives vis-à-vis d'hyménoptères (de Maagd *et al.*, 2001). Le CS du HCB considère que ce point mériterait également d'être développé.

Dans le cas de l'exposition d'organismes non-cibles *via* des déjections animales, le document « Main text » conclut également que les conséquences écologiques seraient limitées du fait des faibles quantités de protéines retrouvées dans les déjections animales. Cependant, le pétitionnaire ne présente pas de données quant aux concentrations de toxine Cry14Ab-1 contenues dans les fèces d'animaux ayant consommé des produits issus de soja GBM 151, se contentant de dire que celles-ci seraient dégradées lors de la digestion.

Or, la présence de Cry14Ab-1 dans les fèces pourrait avoir des conséquences sur les cycles biogéochimiques (par exemple, une partie des organismes fousseurs de matière organique sont des coléoptères dont certaines espèces sont sensibles à la présence d'autres protéines Cry dans les fèces d'animaux ayant consommé des plantes les exprimant (Campos *et al.*, 2018)).

Le CS du HCB demande que ce point soit développé par le pétitionnaire et que ce risque d'exposition des organismes non-cibles à la toxine Cry14Ab-1 contenue dans les fèces d'animaux ayant consommé des produits issus de soja GBM 151 soit pris en considération.

Enfin, dans le but d'analyser les informations de la partie 5.3.4. relative aux interactions du soja GMB151 avec les organismes non-cibles, le CS du HCB a analysé toutes les données relatives à la protéine Cry14Ab-1 dans la totalité du dossier. Pour le CS du HCB, certaines affirmations mériteraient d'être reformulées ou corrigées :

Digestibilité des protéines Cry

Page 15 en introduction. Les auteurs indiquent que la protéine Cry14Ab est instable et rapidement dégradée dans le milieu gastrique et intestinal. Ils fondent cette affirmation sur des résultats présentés dans les annexes M-478215-01-1 et M-478845-01-1. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions extrêmes (incubation à pH 1,2 en présence de pepsine) qui ne reflètent pas la réalité (Guimaraes *et al.*, 2010). En ce qui concerne le milieu intestinal, ils observent une dégradation partielle (90%) après une incubation d'une heure à 37°C en présence de pancréatine. Malgré cette dégradation supposée rapide des protéines, il a été montré que l'ingestion de toxine Cry5 chez le porc, le chien, le hamster ou la souris permettait d'éliminer des nématodes intestinaux (Hu *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2018; Urban *et al.*, 2013).

Si les auteurs veulent démontrer l'instabilité de la toxine Cry14Ab, le CS du HCB demande à ce que les expériences soient faites dans un milieu mimant réellement les conditions physiologiques (Guimaraes *et al.*, 2010) et non dans des conditions extrêmes.

Activation des protoxines Cry

Pages 106-107. Les auteurs indiquent que l'activation des protoxines Cry se fait à pH alcalin – ce qui est bien le cas avec les toxines Cry actives contre les lépidoptères. En revanche, le parallèle ne peut certainement pas être fait avec les protéines Cry actives sur les nématodes puisque ceux-ci ont un pH intestinal neutre ou acide (Chauhan *et al.*, 2013). Le CS du HCB suggère que cette partie du texte "The Cry proteins require alkaline conditions and specific proteases and receptors, resulting in a narrow host range" soit modifiée ou supprimée si les auteurs n'apportent pas la preuve que la protoxine Cry14Ab-1 requiert un pH alcalin pour être activée.

Innocuité des protéines Cry

Pages 106-107.

“Cry proteins are produced by *B. thuringiensis* strains and demonstrate specific toxicity towards insects and nematodes.”

“Cry proteins have been used for over 50 years as an environmentally safe and effective alternative to synthetic pesticides.”

Le CS du HCB considère qu'on ne peut pas conclure que d'une façon générale les protéines Cry sont toxiques spécifiquement sur insectes et nématodes, et sans danger pour l'environnement (risques d'apparition de résistance). En conséquence, ces phrases devraient être reformulées ou supprimées (pages 106-107).

5.3.5 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

Ce point n'est pas abordé dans le dossier, du fait qu'il s'agit d'une demande de mise sur le marché pour l'importation, la transformation, et l'alimentation humaine et animale. Cependant, l'impact de la culture de la variété de soja GMB151 dans les pays producteurs mériterait d'être examiné.

D'un point de vue agronomique, les herbicides inhibiteurs de l'HPPD sont concernés par des phénomènes d'évolution de résistance chez les populations de plantes adventices visées (weedsience.org). L'autorisation de mise sur le marché du soja GMB151 pouvant entraîner un usage accru de ces herbicides, elle pourrait contribuer à la sélection de nouvelles populations résistantes, et possiblement de populations présentant des résistances multiples à plusieurs herbicides. La possibilité que ces populations résistantes se disséminent en dehors des zones de cultures du soja GMB151, n'est pas à exclure. Le CS du HCB souligne que la culture du soja GMB151 pourrait donc entraîner des conséquences négatives d'un point de vue agronomique aussi bien dans les pays producteurs que dans les pays tiers.

6. Environmental Monitoring Plan

Le plan de surveillance générale correspond aux exigences réglementaires de l'UE et les indications données sont conformes à la réglementation en vigueur. Le rapport annuel de surveillance, déterminé selon le format standard établi par la Commission européenne (*Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275/9 21.10.2009 (2009/770/EC)*), devra informer des volumes des importations réalisées dans chaque Etat membre, ainsi que des volumes par destination (localisation et transformations) des importations. Il devra également renseigner tout échappement accidentel de graines intervenu et les mesures concrètes mises en œuvre pour y pallier (au cas par cas).

Une surveillance plus longue que la durée de l'autorisation d'importation et de la période de transformation industrielle ne s'impose pas si l'ensemble des cargaisons importées ont été transformées à cette échéance et qu'un examen des voiries ait été effectué à cette échéance indiquant qu'il n'y a pas eu d'échappement (car le risque qui serait lié à des événements qui ne se sont pas produits n'existe pas). Toutefois, le CS du HCB souligne que si l'écoulement des lots importés n'était pas achevé à la fin de l'autorisation, il serait nécessaire alors que le suivi soit prolongé au-delà de la durée de l'autorisation.

Le CS du HCB demande au pétitionnaire de se rapprocher des Autorités compétentes en charge de la biosurveillance dans les Etats membres, afin d'harmoniser avec elles, et sous leur contrôle,

les démarches de surveillance à réaliser s'il existe un contexte spécifique existant dans un Etat membre. Le CS du HCB rappelle que ce contexte spécifique existe dans des zones où le climat permet l'existence de populations férales issues de ce soja (en France, dans certains DROM-COM).

3. Bibliographie

Bardgett, R.D., Cook, R., Yeates, G.W., Denton, C.S. (1999) The influence of nematodes on below-ground processes in grassland ecosystems. *Plant and Soil* 212, 23–33.

Campos, R.C., Holderbaum, D.F., Nodari, R.O., Hernandez, M.I.M. (2018). Indirect exposure to Bt maize through pig faeces causes behavioural changes in dung beetles. *Journal of Applied Entomology*, Early View. <https://doi.org/10.1111/jen.12532>

Chauhan, V.M., Orsi, G., Brown, A., Pritchard, D.I., and Aylott, J.W. (2013) Mapping the pharyngeal and intestinal pH of *Caenorhabditis elegans* and real-time luminal pH oscillations using extended dynamic range pH-sensitive nanosensors. *ACS Nano* 7: 5577-5587.

De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17:193-199.

Niblack, T.L. (2005) Soybean cyst nematode management reconsidered. *Plant Dis.* 89 : 1020-1026.

Guimaraes, V., Drumare, M.F., Lereclus, D., Gohar, M., Lamourette, P., Nevers, M.C., Vaisanen-Tunkelrott, M.L., Bernard, H., Guillon, B., Creminon, C., Wal, J.M., and Adel-Patient, K. (2010) In vitro digestion of Cry1Ab proteins and analysis of the impact on their immunoreactivity. *J Agric Food Chem* 58: 3222-3231.

Hou, L., Zhang G, Zao F, Zhu D, Fan X, Zhang Z, Liu X. (2018) VvBAP1 is involved in cold tolerance in *Vitis vinifera* L. *Front. Plant Sci.*, 9 : 726.

Hu, Y., Georghiou, S.B., Kelleher, A.J., and Aroian, R.V. (2010) *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e614.

Hu, Y., Nguyen, T.T., Lee, A.C.Y., Urban, J.F., Jr., Miller, M.M., Zhan, B., Koch, D.J., Noon, J.B., Abraham, A., Fujiwara, R.T., Bowman, D.D., Ostroff, G.R., and Aroian, R.V. (2018) *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein as a new pan-hookworm cure. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8: 287-294.

Hua, J., Grisafi, P., Cheng, S-H., Fink, G. (2001) Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* *BON1* and *BAP1* genes. *Genes Dev.*, 15 : 2263-2272.

Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J.S., Feitelson, J.S., Aroian, R.V. (2000) *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation of Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 1693–1699.

Payne, J. and Narva, K. (1994) Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079.

Siehl, D.L., Tao, Y., Albert, H., Dong, Y., Heckert, M., Madrigal, A., Lincoln-Cabatu, B., Lu, J., Fenwick, T., Bermudez, E., Sandoval, M., Horn, C., Green, J.M., Hale, T., Pagano, P., Clark, J., Udranszky, I.A., Rizzo, N., Bourett, T., Howard, R.J., Johnson, D.H., Vogt, M., Akinsola, G., Castle, L.A. (2014) Broad 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette. *Plant Physiol.* 166 : 1162-1176.

Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W. et al. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463 : 178-183.

Urban, J.F., Jr., Hu, Y., Miller, M.M., Scheib, U., Yiu, Y.Y., and Aroian, R.V. (2013) *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B has potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2263.

Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101 (2009) 1–16.

Wei, J.-Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.-C., Aroian, R.V. (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *PNAS* 100, 2760–2765.

Yang, H., Yang, S., Li, Y., Hua, J. (2007) The *Arabidopsis BAP1* and *BAP2* genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol.*, 145 : 135-146.

Annexe 1 : Saisine

A - 2018 - 476

REÇU LE

21 MARS 2019



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de
l'alimentation

Service des actions
sanitaires en production
primaire

Sous direction de la
qualité, de la santé et de
la protection des
végétaux

Bureau des semences et
de la protection intégrée
des cultures

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Monsieur Jean-Christophe PAGES
Président du Haut conseil des
biotechnologies par intérim
244, boulevard Saint-Germain
75007 PARIS

15 MARS 2019

Paris, le

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

Références : saisine HCB – dossier 2018-153

Affaire suivie par : Anne Grevet

tél. : 01 49 55 56 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 (EFSA). Lorsqu'un dossier est considéré comme valide par l'EFSA, 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'EFSA et est soumis à consultation des États membres :

- dossier EFSA-GMO-NL-2018-153, concernant la mise sur le marché du soja GMB151 pour l'importation, la transformation, l'alimentation humaine et animale.

Les États membres peuvent transmettre leurs commentaires à l'EFSA jusqu'au 8 juin 2019.

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'EFSA au plus tard le 3 juin 2019.

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.

La sous-directrice de la qualité, de la santé
et de la protection des végétaux

Anne-Cécile COTILLON

Annexe 2 : Elaboration de l'avis

Cet avis a été élaboré par le CS du HCB à partir de la discussion de rapports d'expertise et d'un projet d'avis en séance du 16 mai 2019⁶, ainsi que d'échanges ultérieurs par voie électronique, sous la présidence du Dr Jean-Christophe Pagès.

Le CS du HCB est un comité pluridisciplinaire composé de personnalités scientifiques nommées par décret au titre de leur spécialité en relation avec les missions du HCB. Par ordre alphabétique des noms de famille, le CS du HCB est composé de :

Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Avner Bar-Hen, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Thierry Brévault, Bruno Chauvel, Cécile Collonnier, Denis Couvet, Elie Dassa, Barbara Demeinex (démissionnaire), Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Marc Lavielle, Valérie Le Corre, François Lefèvre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Eliane Meurs, Nadia Naffakh, Didier Nègre, Jean-Louis Noyer (démissionnaire), Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Tristan Renault, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte⁷.

Le dossier a été examiné par neuf experts rapporteurs sélectionnés parmi les membres du CS du HCB pour leurs compétences dans les disciplines requises pour l'analyse du dossier.

Les membres du CS du HCB remplissent annuellement une déclaration publique d'intérêts. Ils sont également interrogés sur l'existence d'éventuels conflits d'intérêts avant l'examen de chaque dossier. Aucun membre du CS n'a déclaré avoir de conflits d'intérêts qui auraient pu interférer avec l'élaboration de cet avis.

⁶ Membres du CS présents et représentés lors de la discussion du projet d'avis en séance du 16 mai 2019 : Frédérique Angevin, Claude Bagnis, Marie-Anne Barny, Pascal Boireau, Bruno Chauvel, Elie Dassa, Claudine Franche, Philippe Guerche, Joël Guillemain, Guillermina Hernandez-Raquet, Jamal Khalife, Bernard Klonjkowski, Valérie Le Corre, Olivier Lemaire, Didier Lereclus, Rémi Maximilien, Didier Nègre, Sergio Ochatt, Jean-Christophe Pagès, Xavier Raynaud, Catherine Regnault-Roger, Michel Renard, Patrick Saindrenan, Pascal Simonet, Marie-Bérengère Troadec, Bernard Vaissière, Hubert de Verneuil, Jean-Luc Vilotte.

⁷ Composition du CS en vigueur suite au décret de nomination des membres du HCB du 30 décembre 2014 et à la loi du 2 décembre 2015.

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

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

A2.1. General comments

Main comments

Concerning the molecular analysis

- The insert's possible impact on the expression level of the *BAP1* gene in GMB151 soybean has not been investigated. The HCB Scientific Committee suggests that an expression analysis be performed to check that the insert has no impact on expression of the putative *BAP1* gene encoding a BON1-associated protein 1-like protein.

- In the annex on validation of ELISA methods (STSa-DD0101-01, p. 4), the applicant indicates the existence of two different batches of Cry34Ab-1 proteins being used as standards, namely 1506_Cry14Ab-1 and 1514_Cry14Ab-1. The HCB Scientific Committee requests the applicant to confirm sole use of batch 1514_Cry14Ab-1 for all assays or else to clarify whether the two batches (1506_Cry14Ab-1 and 1514_Cry14Ab-1) are equivalent.

Regarding the comparative analysis

- Regarding the field trials, the HCB Scientific Committee asks that the conventional herbicide treatment (CHM) be specified in the application.

- Regarding the statistical analysis for the comparative analysis, the HCB Scientific Committee asks the applicant to review the explanation of the significant differences (Main text, p.71: "the equivalence test was not valid due to estimated genotypic variance of 0 for the reference varieties; therefore, the differences were considered to be of no biological relevance"). The HCB Scientific Committee requests the applicant to adapt the test methodology if the applicability conditions are not met.

Regarding the environmental risk assessment

- The HCB Scientific Committee asks for further information (experimental or from the literature) to be added to the application to clarify the risk of environmental persistence from accidentally released seed, particularly for the climate conditions of French overseas departments, regions and communities.

- The risks of pollen dispersal and crossing with related species, although limited in metropolitan France and continental Europe, have not been taken into account for French overseas departments, regions and communities. The HCB Scientific Committee would like the specific environmental characteristics of these areas to be taken into consideration in the risk assessment.

- Regarding interaction of GMB151 soybean with target organisms, the HCB Scientific Committee points out that resistance to this nematocidal Cry strategy is found frequently and cultivation of plants not combining different toxins targeting the same pests through different modes of action entails a significant risk of evolution of target pest resistance to Cry toxins, necessitating development of appropriate resistance management strategies and implementation of a case-specific monitoring plan for resistance evolution.

- Regarding interaction of GMB151 soybean with non-target organisms, the application deals with establishment of feral populations and consumption of faeces but not consumption of imported plant material. The HCB Scientific Committee asks that this point be addressed in the application.

Although virtually no literature on the Cry14Ab-1 toxin is cited in the application, it should be noted that this protein has shown nematocidal activity in *in vitro* bioassays on *Caenorhabditis elegans*. Cry14 protein activity against *Diabrotica virgifera* coleopteran larvae has also been cited in a patent (Payne and Narva, 1994). This information has been included in some more recent reviews (de Maagd et al., 2001; van Frankenhuyzen, 2009). However, the results presented in the application indicate a total absence of Cry14Ab-1 activity against this coleopteran (Annex M-573850-01-1). The HCB Scientific Committee requests that this point be discussed and amplified in the application.

In particular, the HCB Scientific Committee requests the applicant to assess the toxicity of Cry14Ab-1 for other Coleoptera, to which quite a number of storage pests belong. This would make it possible to determine whether there is any risk of Cry14Ab-1 resistance developing in these organisms, since GMB151 soybean grain and hulls show measurable concentrations of Cry14Ab-1 toxin in dry matter (in the order of 85 µg/g_{DW} in grain and 25 µg/g_{DW} in hulls; Table 1.3.14).

Lastly, it may be noted that some Cry proteins belonging to the group of nematocidal toxins have been cited as being active against Hymenoptera (de Maagd et al., 2001). The HCB Scientific Committee believes that this point should also be treated at greater length.

In the case of exposure of non-target organisms through animal faeces, the 'Main text' further concludes that the ecological consequences would be limited because of the minimal amounts of protein found in these faeces. However, the applicant offers no data on the Cry14Ab-1 toxin concentrations in faeces of animals fed GBM151 soybean products. The HCB Scientific Committee requests the applicant to elaborate on this point and asks that the risk of exposure of non-target organisms to the Cry14Ab-1 toxin in faeces of animals fed GBM151 soybean products be taken into consideration.

Regarding the monitoring reports and post-market monitoring plan

- The HCB Scientific Committee requests the applicant to contact the competent authorities in charge of biomonitoring in Member States to agree a standard approach, under their supervision, to the monitoring measures required if there is a specific context in a Member State. The HCB Scientific Committee points out that a specific context of this sort exists in areas where the climate permits of feral populations deriving from this soybean (in France, in some French overseas departments, regions and communities).

Additional comments

- The HCB Scientific Committee notes that the European Union has ratified the Convention on Biological Diversity, which makes clear that both exporting and importing countries have international responsibilities regarding biological diversity.

In this respect, some members of the HCB Scientific Committee have emphasised that it is important for EU decisions to take into account the impact of exporting third countries' GMB151 soybean cultivation on biodiversity in the European Union. Consequently, believing that the biological diversity of importing and exporting countries is linked, they would like the application to take note of existing data on the impact of this cultivation on biodiversity in producing/exporting countries.

In addition, they recommend that the regulator take into account in its decisions how import of certain products, whether GM or not, influences crop choice in Europe and the biodiversity consequent upon the associated agrosystems.

- From an agronomic point of view, HPPD-inhibitor herbicides are affected by resistance evolution in the adventive populations concerned (weedsience.org). Since authorisation of placing on the market of GMB151 soybean could entail greater use of these herbicides, it might contribute to selection of new resistant populations and possibly of populations with multiple herbicide resistance. The possibility that these resistant populations might spread outside the areas where GMB151 soybean is grown cannot be ruled out. The HCB Scientific Committee emphasises that cultivation of GMB151 soybean could therefore have adverse agronomic consequences not only in producing countries but also in third countries.

De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17:193-199.

Payne, J. and Narva, K. (1994) Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079.

Van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.

A2.2. Comments per section

1.2. Molecular characterisation

- The bioinformatics analysis shows insertion of T-DNA in soybean chromosome 7 (using the soybean cultivar Williams 82 reference genome (Schmutz et al., 2010)). The insert is located in the 3' sequence of a putative *BAP1* gene encoding a BON1-associated protein 1-like protein (BAP1). BAP1 is a phospholipid-binding protein characterised by a C2 targeting domain in the cell membranes. Functional characterisations of the *BAP1* gene have been established for *Arabidopsis thaliana* (Hua et al., 2001; Yang et al., 2007) and grapevines (Hou et al., 2018). Expression of the *BAP1* gene is induced by a variety of biotic and abiotic stresses (injury, oxidative stress, cold stress). The findings show that *BAP1* is an inhibitor of programmed cell death (Yang et al., 2007).

However, the insert's possible impact on the expression level of this gene in GMB151 soybean has not been investigated. The HCB Scientific Committee suggests that an expression analysis be performed to check that the insert has no impact on expression of the putative *BAP1* gene

encoding a BON1-associated protein 1-like protein, since reduced *BAP1* expression might make plants more susceptible to pathogen attacks and periods of stress, particularly cold stress.

- In the annex on validation of ELISA methods (STSa-DD0101-01, p. 4), the applicant indicates the existence of two different batches of Cry34Ab-1 proteins being used as standards, namely 1506_Cry14Ab-1 and 1514_Cry14Ab-1. In study report 16-RSVLS015-A (Annex M-601077-02-1) on the ELISA assays on different tissues, it is indicated that batch 1514_Cry14Ab-1 was used (Annex M-601077-02-1). The HCB Scientific Committee requests the applicant to confirm sole use of batch 1514_Cry14Ab-1 for all assays or else to clarify whether the two batches (1506_Cry14Ab-1 and 1514_Cry14Ab-1) are equivalent.

- As noted by EFSA (2019-04-16 EFSA to appl_clock remains stopped 2_AP153_ANNEX.pdf), no account has been taken, in the ELISA assays on samples, of the protein extraction efficiencies for the different tissues (STSaDD0101-01, p. 9). The HCB Scientific Committee requests that the Cry34Ab-1 and HPPD-4 protein concentrations shown in Annex M-601077-02-1 be rectified to take account of these factors.

Hua J, Grisafi P, Cheng S-H, Fink G. (2001). Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* *BON1* and *BAP1* genes. *Genes Dev.* 15: 2263-2272.

Hou L, Zhang G, Zao F, Zhu D, Fan X, Zhang Z, Liu X. (2018). *VvBAP1* is involved in cold tolerance in *Vitis vinifera* L. *Front. Plant Sci.* 9: 726.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.

Yang H, Yang S, Li Y, Hua J. (2007). The *Arabidopsis* *BAP1* and *BAP2* genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol.* 145: 135-146.

1.3. Comparative analysis

1.3.2. Experimental design and statistical analysis of data from field trials for comparative analysis

- Regarding the field trials, it is stated that all varieties received conventional herbicide management treatment (CHM), to which was added treatment with isoxaflutole at a rate of approximately 70.1 g/ha. The HCB Scientific Committee asks that the conventional herbicide treatment be specified.

- Regarding the statistical analysis for the comparative analysis, the HCB Scientific Committee asks the applicant to review the explanation of the significant differences (Main text, p.71: “the equivalence test was not valid due to estimated genotypic variance of 0 for the reference varieties; therefore, the differences were considered to be of no biological relevance”). The HCB Scientific Committee requests the applicant to adapt the test methodology if the applicability conditions are not met. For instance, zero genotypic variance for the reference varieties (p.71) undeniably calls into question the relevance of the model chosen.

Furthermore, since no adjustment seems to have been made for the multiple tests, the test thresholds themselves are extremely debatable.

1.3.5. Comparative analysis of agronomic and phenotypic characteristics

- In the analysis of phenotypic characteristics relating to the experimental results for comparison of GMB151 soybean with reference varieties treated with isoxaflutole, the values given in Table 1.3.13 (Main text, p.101) for the “Days to flowering” variable are all the same. The HCB Scientific Committee requests that these values in the table be checked and rectified if necessary.

5.3 Specific areas of risks

5.3.1 Persistence and invasiveness including plant-to-plant gene flow

Establishment of feral plants from seed released into the environment

In general, the application offers little information on germinating power and seed survival.

After import, dissemination of transgenes through seed dispersal and establishment of volunteers is very unlikely for the following reasons:

- Optimum thermal conditions for soybean seed germination are quite warm;
- Soybean is an originally tropical species susceptible to frost;
- Seedlings need adequate nitrogen nutrition to grow, which is difficult to provide without nitrogenous fertiliser or *Bradyrhizobium japonicum* inoculum, the latter being added at seeding in continental Europe, since it is not present in these soils.

The risk of soybean volunteers or establishment of feral populations thus appears to be extremely low in continental Europe. However, this statement would have to be qualified for some French overseas departments, regions or communities where the climate is more conducive to soybean volunteers.

Consequently, the HCB Scientific Committee asks for further information (experimental or from the literature) to be provided in order to clarify the risk of environmental persistence from accidentally released seed, particularly for the climate conditions of French overseas departments, regions and communities. One alternative would be to exclude these regions from the marketing area.

Crossing with related species

As stated by the applicant, there are no wild species related to genus *Glycine* sp. in Europe. The risk of crossing therefore seems to be very limited in metropolitan France and continental Europe. However, the application does not take into account the risks of pollen dispersal and crossing with related species in the French overseas departments, regions and communities. The HCB Scientific Committee would like the specific environmental characteristics of these areas to be taken into consideration in the risk assessment (in particular, up-to-date information is expected on the distribution range of the *Soja* subgenus species, to which not only *G. max* but also *Glycine soja* and *Glycine gracilis* belong: wild and semi-wild species of Asian origin that are soybean relatives and for which fertile interspecific hybrids have been easily obtained). One alternative would be to exclude these regions from the marketing area.

5.3.3. Interactions between the GM plant and target organisms

The HCB Scientific Committee wishes to point out that the literature review is particularly weak on the specific issue of target organisms. Many major bibliographical references in the field are missing.

Furthermore, resistance to this nematicidal Cry strategy is found frequently. The HCB Scientific Committee points out in particular that cultivation of plants not combining different toxins targeting the same pests through different modes of action entails a significant risk of evolution of target pest resistance to Cry toxins, necessitating development of appropriate resistance management strategies and implementation of a case-specific monitoring plan for resistance evolution.

5.3.4. Interactions of the GM plant with non-target organisms (NTOs)

Given that the application concerns import, processing and food and feed uses of a genetically modified organism, exposure of non-target organisms may occur either directly, through establishment of feral plant populations or consumption of variously refined plant material by non-target organisms, or indirectly, through consumption of animal faeces if the plant is used for animal nutrition.

It should be noted that the application deals with establishment of feral populations and consumption of faeces but not consumption of imported plant material. The HCB Scientific Committee asks that this point be addressed in the application. In the light of the bibliography and given the non-specific action of Cry proteins on plant-parasitic nematodes, this soybean, if used as feed, could affect the gastrointestinal nematodes of livestock.

Since establishment of feral populations of GM soybean from imported biological material is relatively marginal in France, the application states that the risk of a direct impact is minimal. However, this does not rule out an impact from consumption of imported plant material by populations of non-target organisms.

Although virtually no literature on the Cry14Ab-1 toxin is cited in the application, it should be noted that this protein has shown nematicidal activity in *in vitro* bioassays on *Caenorhabditis elegans*. Cry14 protein activity against *Diabrotica virgifera* coleopteran larvae has also been cited in a patent (Payne and Narva, 1994). This information has been included in some more recent reviews (de Maagd et al., 2001; van Frankenhuyzen, 2009). However, the results presented in the application indicate a total absence of Cry14Ab-1 activity against this coleopteran (Annex M-573850-01-1). The HCB Scientific Committee requests that this point be discussed and amplified in the application.

In particular, the HCB Scientific Committee requests the applicant to assess the toxicity of Cry14Ab-1 for other Coleoptera, to which quite a number of storage pests belong. This would make it possible to determine whether there is any risk of Cry14Ab-1 resistance developing in these organisms, since GMB151 soybean grain and hulls show measurable concentrations of Cry14Ab-1 toxin in dry matter (in the order of 85 µg/g_{DW} in grain and 25 µg/g_{DW} in hulls; Table 1.3.14).

Lastly, it may be noted that some Cry proteins belonging to the group of nematicidal toxins have been cited as being active against Hymenoptera (de Maagd et al., 2001). The HCB Scientific Committee believes that this point should also be treated at greater length.

In the case of exposure of non-target organisms through animal faeces, the 'Main text' further concludes that the ecological consequences would be limited because of the minimal amounts of protein found in these faeces. However, the applicant offers no data on the Cry14Ab-1 toxin

concentrations in faeces of animals fed GBM151 soybean products, simply stating that these concentrations would be degraded during digestion.

Yet the presence of Cry14Ab-1 in faeces could affect biogeochemical cycles (for example, some burrowing organisms that promote incorporation of organic matter in the soil are Coleoptera, some species of which are sensitive to the presence of other Cry proteins in faeces of animals having consumed plants expressing these proteins (Campos et al, 2018)).

The HCB Scientific Committee requests the applicant to elaborate on this point and asks that the risk of exposure of non-target organisms to the Cry14Ab-1 toxin in faeces of animals fed GBM151 soybean products be taken into consideration.

Lastly, in order to analyse the information in Section 5.3.4 on interactions of GMB151 soybean with non-target organisms, the HCB Scientific Committee has studied all the data relating to the Cry14Ab1 protein in the entire application. In the HCB Scientific Committee's opinion, some statements ought to be reworded or rectified:

-Digestibility of Cry proteins

Introduction, page 15. The authors explain that the Cry14Ab protein is unstable and quickly degraded in simulated gastrointestinal conditions. They base this statement on the results presented in Annexes M-478215-01-1 and M-478845-01-1. These results were obtained in extreme conditions (incubation in the presence of pepsin at pH 1.2) that do not reflect reality (Guimaraes et al., 2010). As for the intestinal conditions, they find partial degradation (90%) after incubation of one hour at 37°C in the presence of pancreatin. Despite this supposedly rapid protein degradation, it has been shown that ingestion of the Cry5 toxin by pigs, dogs, hamsters and mice can eliminate intestinal nematodes (Hu et al., 2010; Hu et al., 2018; Urban et al., 2013).

If the authors wish to prove the instability of the Cry14Ab toxin, the HCB Scientific Committee requests that the experiments be performed in an environment reflecting actual physiological conditions (Guimaraes et al., 2010) rather than extreme conditions.

-Activation of Cry protoxins

Pages 106-107. The authors explain that Cry protoxins are activated in alkaline pH conditions – which is certainly the case for the Cry toxins active against Lepidoptera. On the other hand, a parallel certainly cannot be drawn with the Cry proteins active against nematodes, since the latter have a neutral or acid intestinal pH (Chauhan et al., 2013). The HCB Scientific Committee suggests that the sentence “The Cry proteins require alkaline conditions and specific proteases and receptors, resulting in a narrow host range” be amended or deleted if the authors fail to provide evidence that the Cry14Ab-1 protoxin requires an alkaline pH to be activated.

-Safety of Cry proteins

The HCB Scientific Committee believes that it is not possible to draw the general conclusion that Cry proteins are toxic specifically to insects and nematodes and without danger to the environment (resistance development risk). Consequently, the following two sentences ought to be reworded or deleted (*pages 106-107*).

“Cry proteins are produced by *B. thuringiensis* strains and demonstrate specific toxicity towards insects and nematodes.”

“Cry proteins have been used for over 50 years as an environmentally safe and effective alternative to synthetic pesticides.”

Campos, R.C., Holderbaum, D.F., Nodari, R.O., Hernandez, M.I.M. (2018). Indirect exposure to Bt maize through pig faeces causes behavioural changes in dung beetles. *Journal of Applied Entomology*, Early View. <https://doi.org/10.1111/jen.12532>

Chauhan, V.M., Orsi, G., Brown, A., Pritchard, D.I., and Aylott, J.W. (2013). Mapping the pharyngeal and intestinal pH of *Caenorhabditis elegans* and real-time luminal pH oscillations using extended dynamic range pH-sensitive nanosensors. *ACS Nano* **7**: 5577-5587.

De Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* **17**:193-199.

Guimaraes, V., Drumare, M.F., Lereclus, D., Gohar, M., Lamourette, P., Nevers, M.C., Vaisanen-Tunkelrott, M.L., Bernard, H., Guillon, B., Creminon, C., Wal, J.M., and Adel-Patient, K. (2010). In vitro digestion of Cry1Ab proteins and analysis of the impact on their immunoreactivity. *J Agric Food Chem* **58**: 3222-3231.

Hu, Y., Georghiou, S.B., Kelleher, A.J., and Aroian, R.V. (2010). *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e614.

Hu, Y., Nguyen, T.T., Lee, A.C.Y., Urban, J.F., Jr., Miller, M.M., Zhan, B., Koch, D.J., Noon, J.B., Abraham, A., Fujiwara, R.T., Bowman, D.D., Ostroff, G.R., and Aroian, R.V. (2018). *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein as a new pan-hookworm cure. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **8**: 287-294.

Payne, J. and Narva, K. (1994). Process for controlling corn rootworm larvae. Patent WO94/16079.

Urban, J.F., Jr., Hu, Y., Miller, M.M., Scheib, U., Yiu, Y.Y., and Aroian, R.V. (2013). *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B has potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *PLoS Negl Trop Dis* **7**: e2263.

Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**: 1-16.

5.3.5 Impacts of the specific cultivation, management and harvesting techniques

This point has not been addressed in the application, as the latter concerns placing on the market for import, processing and food and feed uses. However, the impact of GMB151 soybean cultivation in the producing countries ought to be considered.

From an agronomic point of view, HPPD-inhibitor herbicides are affected by resistance evolution in the adventive populations concerned (weedsience.org). Since authorisation of placing on the market of GMB151 soybean could entail greater use of these herbicides, it might contribute to selection of new resistant populations and possibly of populations with multiple herbicide resistance. The possibility that these resistant populations might spread outside the areas where GMB151 soybean is grown cannot be ruled out. The HCB Scientific Committee emphasises that cultivation of GMB151 soybean could therefore have adverse agronomic consequences not only in producing countries but also in third countries.

6. Environmental monitoring plan

The general surveillance plan meets EU regulatory requirements, and the information supplied complies with existing rules. The annual monitoring report, produced in the standard format established by the European Commission (Commission Decision of 13 October 2009 /OJ L275, 21.10.2009, pp. 9-27 (2009/770/EC)), ought to provide information on volumes imported into each Member State, as well as import volumes by destination (import and processing locations). It should also report any accidental release of seed and the corresponding remedial action (in each case).

Surveillance beyond the duration of the consent period for import and industrial processing is not required if all shipments imported have been processed by this time and if the road monitoring carried out at the end of the consent period shows that there has been no spillage (since there is no risk attached to events that have not occurred). However, the HCB Scientific Committee notes that if the consignments imported were not exhausted by the end of the consent period, it would then be necessary to extend monitoring beyond the duration of this period.

The HCB Scientific Committee requests the applicant to contact the competent authorities in charge of biomonitoring in Member States to agree a standard approach, under their supervision, to the monitoring measures required if there is a specific context in a Member State. The HCB Scientific Committee points out that a specific context of this sort exists in areas where the climate permits of feral populations deriving from this soybean (in France, in some French overseas departments, regions and communities).