

Maisons-Alfort, le 8 juillet 2008

AVIS
de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à la demande de mise sur le marché d'un cotonnier génétiquement
modifié GHB614, tolérant au glyphosate, pour l'importation et la
transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine
et animale de graines et de produits dérivés, au titre du règlement (CE)
n°1829/2003.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie le 7 avril 2008 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande de mise sur le marché d'un cotonnier génétiquement modifié GHB614, tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de cet OGM ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de produits dérivés, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-NL-2007-51).

Conformément à ce règlement, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, génétiquement modifiés et de rendre un avis à la Commission européenne. L'AESA a cependant décidé de permettre aux Etats-membres de faire connaître leurs observations sur le dossier initial. C'est dans le cadre de cette procédure que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'AFSSA.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 19 juin 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

(A) Information générale

Le cotonnier est une plante du genre *Gossypium* appartenant à la famille des Malvacées. On compte près d'une cinquantaine d'espèces sauvages appartenant au genre *Gossypium*. Les cotonniers sont des plantes des régions sub-tropicales à tropicales dont les fruits sont des capsules contenant des graines velues. La culture des cotonniers est marginale en Europe (Espagne et Grèce), de même que l'importation des produits issus de la graine. Ces produits sont principalement l'huile destinée à l'alimentation humaine et le tourteau destiné à l'alimentation animale.

La présente demande porte sur la mise sur le marché d'un cotonnier génétiquement modifié GHB614, tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de graines ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de ses produits dérivés. Elle ne concerne pas sa mise en culture dans l'Union européenne.

Les cotonniers GHB614 ont été génétiquement modifiés afin d'introduire dans leur génome une cassette d'expression du gène muté codant la protéine mEPSPS (5-énol pyruvyl-3-phosphoshikimique acide synthétase) de maïs insensible au glyphosate. La présence d'une EPSPS tolérante au glyphosate s'exprimant dans les chloroplastes permet le maintien de la synthèse d'acides aminés et donc la survie de la plante lorsqu'elle est soumise à un traitement par l'herbicide.

(B) Informations relatives à la modification génétique

Les cotonniers génétiquement modifiés GHB614 ont été obtenus par transformation à l'aide d'une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche C58C1^{Rif}) portant le vecteur binaire de transformation pTEM2. Le vecteur de transformation pTEM2 comporte l'origine de répllication du plasmide dans *E coli*, deux gènes de sélection bactériens *aadA* et *nptI* et l'ADN-T qui comprend la cassette d'expression du gène *2mepsps*.

L'ADN-T est composé de :

- la bordure gauche (24pb), élément d' *A. tumefasciens* permettant le transfert de l'ADN-T.
- le promoteur (1010pb, *Ph4a748At*) de l'histone H4 d'*Arabidopsis thaliana*
- l'intron (516pb, *intron1h3At*) du gène II de l'histone H3.III d'*Arabidopsis thaliana*;
- la séquence SS-SSU-CTP (372pb) de tournesol et de maïs (*Helianthus annuus* et *Zea mays*) qui code pour un peptide d'adressage dans les chloroplastes
- le gène *2mepsps* (1337pb) de maïs (*Zea mays*) codant l'enzyme EPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase) mutée, résistante au glyphosate
- la séquence de terminaison (742pb, *3'histonAt*) du gène codant l'histone H4 issue d'*Arabidopsis thaliana*.
- la bordure droite (24pb), élément d' *A. tumefasciens* permettant le transfert de l'ADN-T.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Les cotonniers portant l'événement de transformation GHB614 expriment la mEPSPS de maïs insensible au glyphosate suite à la modification par mutagenèse dirigée de deux acides aminés en position 102 (Thr→Ile) et 106 (Pro→Ser). Ce même gène a été transféré dans les maïs portant l'événement de transformation GA21 leur conférant également la résistance au glyphosate.
- (2) Des hybridations de type Southern ont été réalisées avec différentes sondes issues du plasmide pTEM2, sur de l'ADN du cotonnier témoin non transformé (variété Coker 312, utilisée pour la transformation), de l'ADN du cotonnier GHB614 et de l'ADN du vecteur pTEM2. L'analyse des résultats montre que l'insertion est unique dans le génome du cotonnier et que la séquence de l'insert présent dans GHB614 correspond à celle du plasmide pTEM2. Des hybridations avec cinq sondes choisies en dehors de l'ADN-T et couvrant l'ensemble des régions du vecteur ont permis de montrer qu'aucune insertion des éléments du vecteur autre que l'ADN-T n'est présente dans le génome du cotonnier GHB614.

La séquence complète de l'insert a été établie à partir de fragment amplifié de l'ADN du cotonnier GHB614. La séquence de l'insert GHB614 est rigoureusement identique à celle du T-DNA présent dans le plasmide pTEM2.

Les séquences des régions 5' (214pb) et 3' (738 pb) bordant l'insert ont été déterminées et correspondent à des séquences du génome de cotonnier, toutefois il aurait été souhaitable de disposer de séquences plus longues, en particulier en 5'. Une délétion de 17 pb, probablement survenue au moment de l'intégration de l'ADN-T a été observée dans le cotonnier génétiquement modifié. Sur la base des données de séquence fournies, l'insertion ne semble pas avoir interrompu de gène.

L'analyse bio-informatique des fragments de bordure 5' et 3' fait état de deux ORFs chimériques putatives localisées dans la région 5' de l'insert. La recherche de région promotrice, de région similaire à des sites de liaison des ribosomes (RBS) et de signaux de polyadénylation a été infructueuse, il est donc peu probable que ces séquences puissent s'exprimer. L'absence d'expression a été confirmée par des analyses de type Northern. Les polypeptides putatifs déduits des ORF ne montrent pas d'homologie avec des allergènes et des toxines connus répertoriés dans les bases de données.

(3) Informations relatives à l'expression du produit du transgène

L'expression du gène *mepsps* dans la plante a été mesurée au niveau transcriptionnel par Northern Blot et au niveau protéique par ELISA, en utilisant des anticorps polyclonaux, sur des échantillons de cotonniers GHB614 cultivés en serre.

Les teneurs en protéines mEPSPS ont été mesurées dans 5 tissus différents à 4 stades de développement de la plante. Comme attendu en raison de la spécificité du promoteur utilisé, les teneurs maximales sont retrouvées dans les tissus verts en croissance, comme les jeunes feuilles (11,16 µg/g de poids frais) et l'apex (5,47µg/g de poids frais).

Au moment de la récolte, la protéine 2mEPSPS est présente dans les feuilles (0,24-0,53% des protéines totales) et dans les graines (0,047-0,086% des protéines totales), ce qui correspond à 36,3 +/- 7,2 µg/g de poids frais.

Le traitement au glyphosate n'a pas d'influence sur le niveau d'expression de la protéine mEPSPS.

La protéine 2mEPSPS a été mesurée dans les produits dérivés destinés à la consommation humaine et animale. Elle est présente dans les tourteaux non chauffés mais n'est pas détectée dans les tourteaux chauffés, dans l'huile brute, raffinée ou désodorisée.

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

La stabilité génétique de l'insert présent dans les cotonniers GHB614 a été vérifiée par des expériences de Southern sur 4 générations (T3, T4, T5, T6) ainsi qu'à partir de cotonniers cultivés dans des conditions environnementales variées (6 localisations). La stabilité et la transmission selon les lois mendéliennes du caractère apporté par le transgène ont été démontrées en analysant la ségrégation de différent type de descendants (hémizygote autofécondée, hémizygote x lignée conventionnelle). L'analyse des résultats indique que l'événement GHB614 se comporte comme un allèle présent en un seul locus dans le génome nucléaire.

(7) **Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**

(7.1-3) **Analyse de composition chimique**

Les analyses de composition chimique ont été réalisées à partir d'échantillons de cotonniers GHB614, cultivés sur 17 sites aux Etats-Unis au cours des saisons 2005 et 2006 (3 répétitions par site), et comparées à celle d'échantillons provenant d'un cotonnier témoin (Coker 312, variété ayant été utilisée pour la transformation) ainsi qu'aux données publiées dans la littérature.

Deux types de traitement ont été appliqués aux cultures :

- ✓ un herbicide conventionnel pour le cotonnier GHB614 et Coker 312
- ✓ le glyphosate pour le cotonnier GHB614.

Le modèle statistique (analyse de variance) appliqué consiste à comparer 2 à 2 les données issues du cotonnier GHB614 à celles de la variété Coker 312 ayant subi le même traitement conventionnel par l'herbicide et les données issues du cotonnier GHB614 traité par le glyphosate à celles de la variété Coker 312.

Les composés suivants des graines entières de cotonniers ont été mesurés et analysés :

- 1) les paramètres proximaux (protéines et lipides totales, cendres, hydrates de carbones, fibres solubles dans des détergents acides et neutres)
- 2) 6 minéraux et 3 composés de la vitamine E,
- 3) 4 facteurs anti-nutritionnels dont le gossypol,
- 4) 18 acides aminés et 11 acides gras (saturés, mono-insaturés, poly-insaturés C14-C24).

Quelques différences statistiquement significatives sont observées pour les teneurs de certains acides gras et pour les facteurs anti-nutritionnels (acide malvalique et stérulique). Pour ces derniers, les teneurs diminuent légèrement dans les graines de cotonniers GHB614.

Pour les autres composés chimiques, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les graines de cotonniers génétiquement modifiés et de témoin.

Toutes les teneurs mesurées sont situées dans la plage de fluctuation des données publiques des principales variétés de cotonniers

Une seconde analyse des composés chimiques évoqués ci dessus, a été réalisée sur les produits issus de la graine : la graine sans fibre, la fibre, les coques, les tourteaux (chauffés ; non chauffés). Aucune différence significative de composition n'a été observée entre les produits issus des cotonniers GHB614 traités ou non traités par le glyphosate, d'une part et ceux issus du cotonnier témoin Coker 312, d'autre part.

Enfin, l'analyse comparée de la composition en acides gras de l'huile (brute et raffinée désodorisée) montre une concentration en acide myristique (C14 :0) plus faible dans l'huile raffinée et désodorisée provenant de la variété GHB614 que dans la même fraction de la variété de référence Coker 312. Cette faible différence n'est cependant pas observée pour l'huile brute.

(7.5) **Spécification des produits issus de la graine**

Quatre types de produits sont extraits des graines de cotonnier dont les trois premiers sont utilisés pour l'alimentation humaine et/ou animale 1) l'huile utilisée directement ou après transformation, 2) les tourteaux qui correspondent à la partie solide résultant de l'extraction de l'huile 3) les coques 4) la fibre qui contient essentiellement de la cellulose et est utilisée pour les usages non alimentaires.

L'huile de cotonnier (principal produit destiné à l'alimentation humaine) est peu sensible à l'oxydation en raison de la nature de ses acides gras qui ont en majorité pas plus de deux doubles liaisons. Les tourteaux sont riches en protéines et sont utilisés comme aliment pour les ruminants. Les différentes toxines que contiennent les tourteaux les rendent impropres à la consommation pour des animaux monogastriques si aucun procédé de préparation approprié n'est mis en œuvre.

(7.6) **Effet du procédé de traitement**

Les traitements que subissent les graines de cotonnier conventionnel pour obtenir les différents produits alimentaires sont un chauffage (par action de la vapeur d'eau à haute pression) et des étapes d'extraction par des solvants et par des solutions alcalines.

(7.7) **Utilisation et consommation prévue**

Les cotonniers GHB614 ont pour vocation à être utilisés comme les cotonniers conventionnels sous tous les modes de consommation chez l'homme et l'animal.

La protéine 2mEPSPS n'est pas détectée dans les huiles alimentaires fabriquées à partir des cotonniers GHB614 et ces huiles ont été démontrées comme étant substantiellement équivalentes à celles issues de cotonniers non génétiquement modifiés.

Des données relatives à la quantité de protéine 2mEPSPS présente dans les produits issus du coton GHB614 destinés à l'alimentation animale ont été fournies.

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) **Évaluation de la sécurité de la protéine 2mEPSPS**

La sécurité de la protéine 2mEPSPS a déjà été évaluée à plusieurs reprises puisqu'elle est exprimée dans différentes espèces de plantes génétiquement modifiées précédemment autorisées (maïs GA21).

Les protéines EPSPS sont présentes à l'état naturel dans de nombreux microorganismes et plantes (soja, maïs, riz, vigne, laitue, tomate). Le gène *mepsps* modifié de maïs code une protéine de 47kDa qui diffère de la protéine de maïs par 2 acides aminés (99,5 % d'identité). Elle est ainsi insensible au glyphosate mais conserve ses propriétés enzymatiques qui conduisent à la formation du 5-énolpyruvyl-3-shikimate phosphate (EPSPS).

La protéine 2mEPSPS ne présente aucune homologie de séquence avec les allergènes et les toxines connues. Elle est rapidement dégradée (30 secondes) en présence de pepsine en milieu acide (fluide gastrique simulé) et en présence de pancréatine à pH7.5 (fluide intestinal simulé).

Le niveau de protéine mEPSPS exprimée dans la plante étant très faible et insuffisant pour réaliser les essais de toxicité, le gène codant cette protéine a donc été cloné dans *E. coli* afin d'obtenir la protéine en grande quantité. L'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine produite dans la plante et dans la bactérie a été démontrée (poids moléculaire, immuno-réactivité, profil de glycosylation, activité enzymatique, identité de séquence N-terminale, profil de digestion tryptique). L'essai de toxicité aiguë réalisé chez la souris par administration d'une dose unique de protéine (pureté>99%) montre qu'à la dose maximale administrée de 2000 mg/kg p.c., aucune différence n'a été observée sur la croissance des animaux (5 femelles) et sur les examens macroscopiques effectués après le sacrifice à 15 jours après le traitement.

(7.8.4) Etude la toxicité sub-chronique

Aucune étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat avec l'aliment n'a été réalisée.

(7.9) Allergénicité

Les cotonniers GHB614 expriment la protéine de maïs mEPSPS. L'évaluation de l'allergénicité des cotonniers GHB614 repose sur les éléments suivants :

- ✓ l'organisme donneur (maïs) n'est pas connu pour être une source d'allergène,
- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés de la protéine EPSPS (comparaison de séquences de 80 acides aminés et recherche de 8 acides aminés contigus) avec des séquences de protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités,
- ✓ la protéine 2mEPSPS n'est pas glycosylée,
- ✓ la protéine 2mEPSPS est très rapidement hydrolysée en milieu gastrique et intestinal simulés,
- ✓ la protéine 2mEPSPS est exprimée dans de nombreuses plantes transgéniques et bénéficie d'un historique de consommation en alimentation animale et humaine.

ainsi, l'existence d'un potentiel allergène lié à la consommation de la protéine mEPSPS ne peut pas être suspectée

Il convient de noter que ces données (résultats de dégradation et digestion *in vitro* des protéines et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, à conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.

(7.10) Evaluation nutritionnelle

Une étude d'alimentarité a été réalisée chez le poulet des deux sexes (420 poulets, 140 par traitement, 3 traitements). Les poulets sont nourris pendant 42 jours avec trois régimes successifs (démarrage, croissance et finition) contenant environ 10% de tourteau de cotonnier. Les poulets ayant reçu les tourteaux de cotonnier GHB614 sont comparés à ceux ayant reçu les tourteaux de cotonnier de la variété témoin (équivalent non transgénique) et à ceux ayant reçu des tourteaux d'une variété commerciale de cotonnier.

L'analyse de la composition chimique des tourteaux et des rations a été effectuée pour les paramètres suivants : protéines, lipides, fibres, cendres, matière sèche, calories, amidon, acides-aminés, minéraux, anti-nutriments (gossypol, acide phytique, acide gras cyclopropénoïque). Les traces de métaux lourds et de pesticides (dont le glyphosate) ont été recherchées dans les tourteaux. L'analyse des résultats démontre une équivalence de composition entre les tourteaux et les rations quelle que soit la variété de cotonnier.

Au cours de l'expérience, les observations ont porté sur la santé globale des animaux, le taux de mortalité (3% global), la croissance, la quantité de nourriture absorbée et l'efficacité alimentaire. En fin de traitement, 126 animaux choisis au hasard dans les 3 groupes ont été analysés pour le rendement et le poids de morceaux de découpe (carcasse, 4 muscles, tissu adipeux abdominal).

L'analyse des résultats après analyse statistique ne met en évidence aucune différence, pour l'ensemble des observations décrites ci-dessus, entre les animaux nourris à base de tourteaux provenant de cotonniers génétiquement modifiés GHB614 et ceux nourris à base de tourteaux provenant de cotonniers témoins non transgéniques ou de la variété conventionnelle

Conclusion de l'Agence française de sécurité des aliments

La caractérisation moléculaire de l'insertion présente dans les cotonniers GHB614 est complète.

L'analyse de composition des graines entières et des produits dérivés permet de conclure à l'équivalence en substance entre les graines de cotonnier GHB614 et leurs produits dérivés par rapport au cotonnier témoin et aux variétés de cotonniers conventionnels et de leurs produits dérivés.

L'analyse toxicologique de la protéine mEPSPS est documentée et ne met pas en évidence de risque lié à son ingestion via l'alimentation.

L'étude d'alimentarité réalisée chez les poulets ne met pas en évidence de différence nutritionnelle entre le tourteau de cotonnier GHB614 et le tourteau de cotonnier témoin ou conventionnels.

Toutefois, l'Agence française de sécurité des aliments ne peut se prononcer sur la sécurité sanitaire des cotonniers portant l'événement de transformation GHB614 en l'absence d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours réalisée chez le rat par administration via son alimentation des graines de cotonnier génétiquement modifié.

Il aurait, par ailleurs, été souhaitable de disposer de plus d'informations sur les séquences génomiques bordant cette insertion.

Mots clés : OGM, Cotonnier GHB614, tolérance au glyphosate.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND