

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 4 avril 2019

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché,
au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du cotonnier génétiquement modifié GHB811
développé pour être tolérant à plusieurs herbicides (glyphosate et inhibiteurs d'HPPD)
pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et
animale de cet OGM (dossier n° EFSA-OGM-ES-2018-154)**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 22 janvier 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché, au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003, du cotonnier génétiquement modifié GHB811 développé pour être tolérant à plusieurs herbicides (glyphosate et inhibiteurs d'HPPD) pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-OGM-ES-2018-154).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été effectuée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 21 février et 28 mars 2019 sur la base de rapports initiaux rédigés par six rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides du panel GMO de l'EFSA (2006, 2011) ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous.

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le cotonnier est une plante arbustive de la famille des Malvacées. L'espèce *Gossypium hirsutum*, allotétraploïde originaire d'Amérique centrale, représente la majorité de la production mondiale. Le cotonnier est une plante à croissance indéterminée : sur une même plante, on trouve des fruits, ou capsules, qui renferment des graines ainsi que des boutons floraux. Les fibres qui entourent les graines à maturité sont utilisées dans l'industrie textile. Pour l'alimentation, la graine fournit principalement de l'huile et des tourteaux protéinés. Des substances anti-nutritionnelles sont présentes dans la graine : des phytoalexines terpénoïdes (principalement du gossypol) et des acides gras cyclopropénoïdes (acides sterculique, malvalique et dihydrosterculique). Des variétés sans gossypol, dites "glandless", ont été sélectionnées et sont utilisées en alimentation animale et humaine.

En 2015-2017, les principaux pays producteurs de coton étaient l'Inde, la Chine, les USA, le Pakistan et le Brésil, qui représentaient environ 75 % de la production mondiale. La moyenne estimée de la production mondiale sur les années 2015-2017 était de 23,372 millions de tonnes (OCDE/FAO, 2018). En se basant sur les données FAOStat de 2016, les cotonniers étaient cultivés sur 30,2 millions d'hectares dont 80 % étaient génétiquement modifiés (ISAAA¹, 2017).

Le cotonnier GHB811 est issu d'une variété de l'espèce *Gossypium hirsutum* qui a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant les gènes *2mepsps* et *hppdPW336-1Pa* codant respectivement une 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (protéine 2mEPSPS) et une 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (protéine HPPD W336). La protéine 2mEPSPS confère à la plante la tolérance au glyphosate et la protéine HPPD W336, la tolérance aux inhibiteurs d'HPPD (ex : isoxaflutole).

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du cotonnier GHB811. Il ne concerne pas sa mise en culture.

Si ce cotonnier venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

¹ International service for the acquisition of agri-biotech applications

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur la variété de *Gossypium hirsutum* non transgénique Coker312.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des segments d'hypocotyles.

Des graines de cotonnier variété Coker312 ont été mises à germer. Des segments d'hypocotyles ont été prélevés et co-cultivés avec la souche C58C1_{Rif} d'*A. tumefaciens*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, portant le vecteur binaire pTSH09 ainsi que le plasmide auxiliaire (helper Ti plasmid) pEHA101. pEHA101 possède les gènes de virulence d'*A. tumefaciens* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules de la plante.

Après cette co-culture, les hypocotyles ont été transférés sur milieu d'induction de cal. La callogénèse puis l'embryogénèse somatique se sont déroulées sur milieu sélectif contenant de la ticarcilline (élimination des *A. tumefaciens* résiduelles) et du glyphosate (sélection des cals et embryons transformés). Les embryons ont ensuite été transférés sur un milieu permettant la différenciation de plantules. Enfin, les plantules transformées ont été transférées en serre puis testées pour leur tolérance aux inhibiteurs d'HPPD.

Le plasmide binaire pTSH09 utilisé pour la transformation porte les cassettes d'expression des gènes *2mepsps* et *hppdPW336-1Pa* entre les bordures gauche et droite du même ADN-T.

La cassette d'expression du gène *2mepsps* contient une séquence codante de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase de maïs avec deux substitutions d'acides aminés : une thréonine par une isoleucine en position 102 et une proline par une sérine en position 106. Grâce à ces modifications, la protéine 2mEPSPS présente une moindre affinité de liaison au glyphosate, l'activité enzymatique peut alors être maintenue ce qui au final, permet à la plante de tolérer cet herbicide. Le gène *2mepsps* est placé sous le contrôle :

- du promoteur constitutif Ph4a748 du gène de l'histone H4 d'*Arabidopsis thaliana*,
- de la séquence du premier intron du gène II de l'histone H3 d'*Arabidopsis thaliana*,
- d'une séquence TPotpC permettant la traduction d'un peptide d'adressage au chloroplaste issu des gènes de la petite sous-unité de la RuBisCo² du maïs et du tournesol
- et d'une séquence terminatrice ThistonAt issue du gène de l'histone H4 d'*Arabidopsis thaliana*.

La cassette d'expression du gène *hppdPW336-1Pa* contient une séquence codante de la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase de la souche A32 de *Pseudomonas fluorescens* avec la substitution en position 336 d'une glycine en tryptophane. La modification de cette protéine (HPPD W336) confère à la plante la tolérance aux inhibiteurs d'HPPD. Le gène *hppdPW336-1Pa* est placé sous le contrôle :

- du promoteur constitutif Pcsvmv issu du virus CsVMV (cassava vein mosaic virus),
- d'une séquence TPotpY-1Pa permettant la traduction d'un peptide d'adressage au chloroplaste issu des gènes de la petite sous-unité de la RuBisCo³ du maïs et du tournesol
- et d'une séquence terminatrice ThistonAt issue du gène de l'histone H4 d'*Arabidopsis thaliana*.

² Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase oxygénase

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

Les analyses de type Southern blot sur le génome du cotonnier GHB811 (générations T1 et BC2F3) montrent l'insertion dans un locus unique d'un seul ADN-T complet, et l'absence des séquences du squelette plasmidique hors ADN-T.

Les amplifications par PCR suivies du séquençage de l'insert (6815 pb) et des régions flanquantes en 5' et en 3' de l'insert (1217 et 1296 pb, respectivement) pour le cotonnier GHB811 et son témoin isogénique Coker312 mettent en évidence une délétion de 13 pb au site d'insertion de l'ADN-T et une absence de réarrangement au sein de l'ADN-T.

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des jonctions et sur l'ADN-T ne mettent en évidence aucune identité globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergéniques connues. De plus, la modification génétique ne semble pas avoir interrompu un gène du cotonnier.

Les teneurs en protéines 2mEPSPS et HPPD W336 dans divers tissus (feuilles, racines, pollen, boutons floraux, capsules, graines et plantes entières) prélevés à différents stades de développement de la plante ont été mesurées à l'aide de test ELISA sur la génération T6. Les plantes du cotonnier GHB811 ont été cultivées aux USA en 2015 avec ou sans traitements avec le glyphosate et l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD). Les concentrations des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 sont quantifiables dans tous les tissus analysés, à l'exception du pollen, dans lequel la protéine HPPD W336 n'est pas détectable. A maturité, dans les graines de cotonnier GHB811 non traité avec le glyphosate et l'isoxaflutole, la concentration moyenne de protéine 2mEPSPS est de 145,11 (\pm 37,86) μ g/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD W336 est de 29,61 (\pm 14,96) μ g/g de matière sèche. A maturité, dans les graines de cotonnier GHB811 traité avec les deux herbicides d'intérêt, la concentration moyenne de protéine 2mEPSPS est de 150,88 (\pm 27,87) μ g/g de matière sèche et la concentration moyenne de protéine HPPD W336 est de 27,01 (\pm 9,78) μ g/g de matière sèche.

L'analyse de ségrégation réalisée permet de conclure que l'insertion est unique, stable et à hérédité mendélienne.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du cotonnier GHB811 permettent de caractériser ce cotonnier et ne sont pas évocateurs d'un risque lié à son utilisation en alimentation humaine ou animale.

II.1.3. Evaluation comparative

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Le cotonnier GHB811 est comparé à son équivalent non transgénique Coker312. Au total, sept variétés commerciales conventionnelles non transgéniques ont été utilisées comme témoins dans les différents essais réalisés en 2014 et 2015.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le cotonnier GHB811, la variété témoin isogénique et les variétés commerciales (3 variétés par site) ont été cultivés sur 7 sites en 2014 et 8 autres sites en 2015. Ces sites étaient répartis dans les zones de production de coton aux USA. Chaque modalité (variété témoin, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée quatre fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Pour la variété génétiquement modifiée, deux

modalités sont réalisées : soit les plantes subissent les mêmes traitements que les variétés témoins, soit elles reçoivent en plus des traitements avec du glyphosate et de l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD). Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011). Des essais prévus sur 6 autres sites n'ont pas été conduits ou n'ont pas été exploitables pour des raisons qui sont présentées dans le dossier.

Sur les 15 sites d'essais existants, les données de 8 sites ont été retenues par le pétitionnaire sans présentation des raisons d'exclusion des 7 autres sites. Le GT « Biotechnologie » considère qu'en l'absence de raison d'exclusion validée, les données de tous les essais au champ doivent être exploitées. L'utilisation des données des 15 sites indiqués par le pétitionnaire comme ayant été poursuivis jusqu'à leur terme est nécessaire à l'évaluation comparative. Il convient donc que les analyses statistiques soient ré-effectuées en ajoutant les données issues des 7 sites exclus à celles des 8 sites retenus dans l'analyse initiale du pétitionnaire ou de justifier les raisons d'exclusion des 7 sites.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) réalisées avec un modèle linéaire mixte incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du cotonnier GHB811 traité ou non avec les herbicides d'intérêt, de la variété témoin ou des variétés commerciales de référence),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Le cotonnier GHB811 est comparé à la variété témoin isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les variables en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de composition a été réalisée sur la graine entière. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2015) à l'exception des vitamines A, B1, B2, B6, C, folate, niacine et sélénium qui n'ont pas été analysés. Le GT « Biotechnologie » estime que cette analyse est incomplète.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Soixante-neuf paramètres ont été mesurés. En l'absence de justification de l'exclusion de 7 sites d'expérimentation, le GT « Biotechnologie » ne se prononce pas sur l'analyse de composition du cotonnier GHB811.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 45 paramètres.

Comme pour l'analyse comparative de la composition, en l'absence de justification de l'exclusion de 7 sites d'expérimentation, le GT « Biotechnologie » considère que les analyses statistiques doivent être réalisées sur les données des 15 essais au champ pour l'analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques. Le GT « Biotechnologie » s'étonne de la grande variabilité des valeurs des paramètres (rendement, poids de 100 graines...) mesurés chez les

variétés commerciales en comparaison de la variété GHB811 et de son témoin isogénique. Cette différence devrait être expliquée par le pétitionnaire.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Les résultats des analyses dans les graines, les fibres courtes (linters), les graines dépelliculées, les tourteaux non toastés, les tourteaux toastés, les pellicules, l'huile brute, l'huile raffinée montrent une équivalence de composition entre le cotonnier GHB811 (traité ou non traité par les herbicides d'intérêt) et les cotonniers témoins.

Les teneurs en protéines 2mEPSPS et HPPD W336 ont été mesurées dans les mêmes produits. Elles sont inférieures aux limites de quantification dans les tourteaux toastés³ et dans les deux types d'huile⁴ qui correspondent aux produits consommés très majoritairement en alimentation animale et humaine.

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, le GT « Biotechnologie » ne peut pas conclure en ce qui concerne l'évaluation comparative du cotonnier GHB811.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

L'évaluation de la sécurité des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 synthétisées par le cotonnier GHB811 se base sur les arguments suivants :

- les familles de protéines EPSPS et HPPD existent dans de nombreux organismes végétaux et micro-organismes ce qui leur apporte un historique d'utilisation sûre en alimentation humaine et animale,
- les protéines 2mEPSPS et HPPD W336 ne présentent pas d'identité de séquences totale, globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2018),
- elles sont présentes en faible quantité dans les graines du cotonnier GHB811 qu'il soit traité ou non avec du glyphosate et un inhibiteur d'HPPD,
- elles montrent une faible résistance à la dégradation pepsique et trypsique (tests de digestions gastrique et intestinale simulées *in vitro*),
- elles sont inactivées par traitement thermique à partir de 55 °C pour la 2mEPSPS et de 45 °C pour la HPPD W336 mais les deux protéines sont partiellement dénaturées.

Le pétitionnaire présente une évaluation de la sécurité de la protéine 2mEPSPS issue du gène muté de maïs (Herouet-Guichenev *et al.*, 2009) et indique que les protéines 2mEPSPS produites par le cotonnier GHB614 et par le soja FG72, plantes génétiquement modifiées ayant fait l'objet d'une évaluation favorable par l'EFSA, sont identiques à celles produites par le cotonnier GHB811. Le pétitionnaire conclut qu'en raison des données fournies sur la protéine 2mEPSPS, il n'est pas nécessaire de conduire une étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez le rongeur spécifiquement dans le cadre de ce dossier sur le cotonnier GHB811.

Le GT « Biotechnologie » considère que l'ensemble des données et arguments présentés par le pétitionnaire et l'état des connaissances sur cette protéine sont suffisants pour documenter la sécurité de la protéine 2mEPSPS.

Deux études de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris C57BL/6J (5 souris par sexe en 1996 et 10 souris par sexe en 2015) ont été réalisées par gavage à la dose de 1000 mg/kg p.c./ jour de la protéine HPPD W336 produite dans *Escherichia coli* dont

³ 0,075 µg/g de poids frais pour 2mEPSPS et 0,60 µg/g de poids frais pour HPPD W336

⁴ 0,00625 µg/g de poids frais pour 2mEPSPS et 0,025 µg/g de poids frais (huile brute) et 0,0125 µg/g de poids frais (huile raffinée) pour HPPD W336

l'équivalence avec la protéine HPPD W336 synthétisée dans le cotonnier GHB811 a été démontrée. Les données de ces études ne semblent pas mettre en évidence d'effets toxiques imputables à la protéine HPPD W336. Toutefois, le GT « Biotechnologie » considère que la fourniture des données historiques des centres investigateurs est indispensable pour réaliser l'expertise des résultats de ces deux études de toxicité et pouvoir conclure sur le potentiel toxique de la protéine HPPD W336.

Le pétitionnaire ne documente pas les interactions potentielles entre les protéines 2mEPSPS et HPPD W336. Ce point devrait être argumenté.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

En dehors des protéines 2mEPSPS et HPPD W336, le cotonnier GHB811 n'est pas développé pour produire de nouveaux constituants. L'évaluation comparative entre le cotonnier GHB811 et le témoin isogénique Coker312 ne met pas en évidence de nouveau constituant dans le cotonnier GHB811.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Aucune analyse n'a été réalisée sur des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux dérivés du cotonnier GHB811.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Une étude de toxicité sub-chronique pendant 90 jours chez le rongeur a été menée en 2018 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données brutes et le programme de calcul ont été fournis.

Trois groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Sprague-Dawley (Crl :CD) ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 10 % (p/p) de tourteau toasté fabriqué à partir des graines de cotonnier de la variété génétiquement modifiée GHB811,
- 10 % (p/p) de tourteau toasté fabriqué à partir des graines de cotonnier de la variété de référence non génétiquement modifiée, Coker312,
- 10 % (p/p) de tourteau toasté fabriqué à partir des graines de cotonnier d'une variété commerciale non génétiquement modifiée FM966.

Le cotonnier GHB811 utilisé dans cette étude est traité avec les deux herbicides d'intérêt, l'isoxaflutole (inhibiteur d'HPPD) puis le glyphosate. Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux différents groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants. Le pétitionnaire fournit un argumentaire convaincant concernant le choix d'une dose maximale de 10 % (p/p). En revanche, seule cette dose maximale a été mise en œuvre dans l'étude au lieu de deux doses selon le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 en vigueur pour ce dossier. Une deuxième dose d'incorporation de tourteau toasté, dose intermédiaire et supérieure à l'apport attendu chez l'Homme ou l'animal cible, est nécessaire pour évaluer la sécurité du cotonnier.

Les données individuelles de l'étude sont fournies mais les données historiques sont des moyennes issues de l'ensemble des centres d'études du prestataire. Le GT « Biotechnologie » indique que les données historiques adéquates sont celles du centre investigateur où a été conduite l'étude de toxicité subchronique.

Le GT « Biotechnologie » considère que le calcul de puissance n'est pas valide. En effet, ce calcul n'est effectué que pour neuf paramètres et les tailles d'effets choisies par le pétitionnaire sans qu'il les justifie (par exemple 200 % pour le cholestérol, 100 % pour la phosphatase alcaline ou 50 % pour la créatinine) ne sont pas considérées comme appropriées. Pour information, l'US EPA (2002) indique que de manière générale, les tailles d'effets doivent être comprises entre 10 et 25 %.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

En l'absence des données historiques des études de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris, il n'est pas possible de conclure complètement sur la sécurité de la protéine HPPD W336. Le GT « Biotechnologie » considère qu'une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rongeur selon les exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 est nécessaire pour renseigner la sécurité du cotonnier GHB811. Elle doit mettre en œuvre deux doses d'incorporation de tourteaux ou de graines entières issues des cotonniers. Une justification biologique des tailles d'effet choisies par le pétitionnaire pour les différents paramètres est nécessaire afin de pouvoir valider le calcul de puissance. Les données historiques fournies devraient être celles du centre investigateur.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du cotonnier GHB811 sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité de la (des) protéine(s) nouvellement exprimée(s)

L'évaluation de l'allergénicité des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 exprimées dans le cotonnier GHB811 se base sur :

- 1) l'absence d'homologies de séquences entre les protéines 2mEPSPS et HPPD W336 et des allergènes connus lorsque la recherche est effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus,
- 2) la dégradation rapide des deux protéines en milieux gastrique et intestinal simulés,
- 3) la faible teneur en protéines 2mEPSPS et HPPD W336 dans les graines de cotonnier GHB811,
- 4) une dénaturation thermique partielle des deux protéines puisqu'elles conservent une partie de leur immunoréactivité vis-à-vis d'anticorps polyclonaux spécifiques.

La séquence codant la protéine 2mEPSPS est dérivée d'un gène de 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase de maïs. Le pétitionnaire rappelle que le maïs n'est pas considéré comme un allergène alimentaire majeur. Le maïs renferme différents allergènes comme la protéine de transfert des lipides (LTP) Zea m 14 (Pastorello *et al.*, 2000) et des protéines de stockage (Fasoli *et al.*, 2009 ; Pasini *et al.*, 2002 ; Scibilia *et al.*, 2008) mais la séquence de la protéine 2mEPSPS ne présente pas d'homologies avec ces allergènes.

La séquence codant la protéine HPPD W336 est dérivée d'un gène de 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase de la souche A32 de *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* est présente dans l'environnement (air, eau, sol) et n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'homologies de séquences entre les protéines 2mEPSPS et HPPD W336 et des toxines ou des protéines adjuvantes connues et répertoriées dans des bases de données actualisées (2018). Par ailleurs, les faibles teneurs de ces protéines dans le cotonnier GHB811 et leurs sensibilités à la protéolyse digestive ne laissent pas supposer qu'elles puissent déclencher un effet adjuvant.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière

En dehors de l'huile, l'utilisation en alimentation humaine de produits dérivés du cotonnier reste très limitée (farines multi-céréales, graines entières) en raison de la présence de gossypol dans la graine. L'huile raffinée, décolorée et désodorisée est exempte de protéines.

Par ailleurs, aucune des informations disponibles ne laisse supposer que le cotonnier GHB811 puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de cotonnier non génétiquement modifiées. Dans ces conditions, le pétitionnaire n'a pas jugé nécessaire, à juste titre, d'effectuer des tests utilisant les IgE spécifiques de patients allergiques.

Le risque allergénique du cotonnier GHB811 semble faible et *a priori* équivalent à celui des variétés de cotonnier conventionnelles.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité

Sur la base des données et arguments fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 exprimées dans le cotonnier GHB811 peut être considéré comme faible. Ces protéines sont présentes en faible quantité dans les graines du cotonnier GHB811 et non mesurables dans l'huile. Elles n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes. Enfin, l'allergénicité du cotonnier GHB811 reste vraisemblablement identique à celle d'un cotonnier conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

Le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle, estimant avoir démontré l'équivalence de composition entre le cotonnier GHB811 et les variétés de cotonnier conventionnelles.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prévission de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

L'estimation de la consommation journalière des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 chez l'animal est fondée sur les données de l'OCDE (2013) relatives à la consommation de tourteau de cotonnier par les animaux d'élevage et un scénario du "pire des cas". Dans ces conditions, la consommation chez les agneaux d'Australie serait au maximum de 3200 µg/kg p.c./jour de protéine 2mEPSPS et de 620 µg/kg p.c./jour de protéine HPPD W336.

En alimentation humaine, le cotonnier est consommé presque exclusivement sous forme d'huile raffinée. Dans la mesure où elle est exempte de protéines, le pétitionnaire considère à juste titre que l'exposition aux protéines 2mEPSPS et HPPD W336 est négligeable pour l'Homme.

II.3 Caractérisation des risques

En l'absence d'études de toxicité et d'alimentarité réalisées sur des animaux de rente, le risque ne peut pas être caractérisé pour ces animaux.

Pour l'Homme, le pétitionnaire présente des calculs de marge de sécurité en se basant sur les données des études de toxicité aiguë chez la souris par administration orale unique des protéines, 2mEPSPS et HPPD W336. Le GT « Biotechnologie » considère que cette démarche n'est pas adaptée, car elle ne permet pas d'estimer le risque associé à une consommation répétée de produits issus du cotonnier GHB811. Il serait plus pertinent de calculer une marge de sécurité à partir de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL⁵) pouvant être déduite de l'étude de toxicité orale subchronique chez le rat par administration réitérée pendant 90 jours plutôt que de déduire des NOAEL à partir d'études de toxicité aiguë.

⁵ No Observed Adverse Effect Level

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

La caractérisation moléculaire du cotonnier GHB811 n'évoque pas de risque particulier en termes de sécurité sanitaire. Le potentiel allergénique des protéines 2mEPSPS et HPPD W336 paraît très faible sur la base des critères d'évaluation retenus par l'EFSA ; l'allergénicité du cotonnier GHB811 reste vraisemblablement identique à celle d'un cotonnier conventionnel.

Sur la base des éléments présentés dans le dossier, il n'est pas possible de conclure sur l'évaluation comparative du cotonnier GHB811, ni sur sa sécurité.

Dans ces conditions le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur la sécurité sanitaire du cotonnier GHB811.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable sur la demande d'autorisation de mise sur le marché du cotonnier GHB811 au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003. Cet avis défavorable est fondé sur le caractère incomplet ou imprécis du dossier fourni par le pétitionnaire qui, en l'état, ne répond pas pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013. Sachant que des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier à la demande de l'EFSA, le contenu du présent avis ne préjuge pas des conclusions qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu d'un dossier complété pour répondre pleinement aux exigences du Règlement européen.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

OGM, cotonnier GHB811, tolérance au glyphosate, tolérance aux inhibiteurs d'HPPD, 2mEPSPS, HPPD W336

GMO, cotton GHB811, glyphosate tolerance, tolerance to HPPD inhibitors, 2mEPSPS, HPPD W336

BIBLIOGRAPHIE

EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." EFSA Journal 99: 1-100.

EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." EFSA Journal 9(5): 2150, 37 pp.

Fasoli, E., Pastorello E.A., Farioli L., Scibilia J., Aldini G., Carini M., Marocco A., Boschetti E. et Righetti P.G.. 2009. "Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools." Journal of Proteomics 72 (3): 501-510.

Herouet-Guicheney C., Rouquié D., Freyssinet M., Currier T., Martone A., Zhou J., Bates E.E.M., Ferullo J-M., Hendrickx K and Rouan D. 2009. "Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants." Regulatory toxicology and pharmacology 54: 143-153.

ISAAA. 2017. "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017 : Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years." ISAAA brief N° 53. ISAAA:Ithaca, NY.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE. 1998. « Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.

OCDE. 2008. « Essai n° 407: Toxicité orale à doses répétées - pendant 28 jours sur les rongeurs », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.

OCDE. 2013. "Guidance Document on Residues in Livestock." Series on Pesticides, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

OCDE. 2015. "Cotton (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*)." Dans Safety assessment of foods and feeds derived from transgenic crops, Volume 2, Éditions OCDE, Paris.

OCDE/FAO. 2018. OECD-FAO agricultural outlook, OECD agriculture statistics (database).

Pasini G., Simonato B., Curioni A., Vincenzi S., Cristaudo A., Santucci B., Dal Belin Peruffo A. et Giannattasio M.. 2002. "IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen." Allergy 57 (2): 98-106.

Pastorello E.A., Farioli L., Pravettoni V., Ispano M., Scibola E., Trambaioli C., Giuffrida M.G, Ansaloni R., Godovac-Zimmermann J., Conti A., Fortunato D. et Ortolani C.. 2000. "The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein." Journal of Allergy and Clinical Immunology 106 (4): 744-751.

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. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.

Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.

Scibilia J., Pastorello E. A., Zisa G., Ottolenghi A., Ballmer-Weber B., Pravettoni V., Scovena E., Robino A. et Ortolani C.. 2008. "Maize food allergy: a double-blind placebo-controlled study." *Clinical & Experimental Allergy* 38 (12): 1943-1949.

US EPA 2002 - Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency