

Maisons-Alfort, le 16 septembre 2005



LA DIRECTRICE GENERALE

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché de pommes de terre
contenant l'événement EH92-527-1 (AMFLORA) et de ses produits dérivés,
présentant une composition modifiée en amidon, pour l'alimentation humaine et
animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 21 juillet 2005 par la Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur un dossier d'autorisation de mise sur le marché de pommes de terre contenant l'événement EH92-527-1, présentant une composition modifiée en amidon, pour l'alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2005-14).

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, 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 ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Afssa.

Après consultation du Comité d'expert spécialisé "Biotechnologie", réuni le 8 septembre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

L'amidon de pomme de terre est "naturellement" constitué d'un mélange d'amylose (16 à 26 % d'un polymère linéaire du glucose branché en α 1-4) et d'amylopectine (polymère branché à la fois en α 1-4 et en α 1-6). L'amylopectine a des propriétés particulières de rétention d'eau, est antigluante et anticollante, ce qui lui confère des propriétés technologiques industrielles intéressantes, notamment pour l'industrie du papier. Cet amidon est également utilisé à l'état natif ou après transformation (dérivés sucrés, ...) dans l'alimentation humaine et animale. La pulpe¹ la plus riche en matière sèche est valorisée en tant que co-produit en alimentation animale, exclusivement destiné aux animaux ruminants (bovins).

L'objectif de la modification génétique réalisée est de modifier la composition en amidon afin de réduire la quantité d'amylose (2 %) pour l'enrichir en amylopectine. Cette pomme de terre a donc une destination exclusivement industrielle pour la préparation d'amidon pur ne contenant pratiquement plus de protéines, celles-ci étant essentiellement localisées dans la peau.

¹ La pulpe de pommes de terre est produite classiquement dans au moins 7 pays européens du Nord sous forme fraîche et ensilée.

(C.) Informations relatives à la modification génétique

Considérant que la transformation dans la pomme de terre a été réalisée par *Agrobacterium tumefaciens* porteur du plasmide pHoxwg dans lequel a été introduite la construction génétique ;

(3) Considérant que la construction génétique comporte :

- un fragment du gène *gbss* codant pour une synthase de l'amidon de pomme de terre GBSS (Granule Bound Starch Synthase) qui a été inséré en orientation inverse par rapport à son promoteur en vue d'inhiber l'expression de cette synthase endogène afin de réduire la quantité d'amylose synthétisée ;
- le gène bactérien *nptII*², sous le contrôle du promoteur *nos*, comme marqueur de sélection et exprimant une résistance à la kanamycine ;

Considérant que la séquence du gène *npt III*, présente sur le plasmide ayant servi à la transformation, n'est pas retrouvée dans le génome de l'hôte ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

(2.d) Considérant que l'insertion n'est présente qu'une seule fois dans le génome de la plante génétiquement modifiée (démonstration par Southern et homogénéité des données de PCR³)

(2.d) Analyse informatique

Considérant que l'analyse informatique des séquences génomiques de part et d'autre de l'insertion montre que celle-ci s'est faite dans une région non codante du génome de la pomme de terre ;

Considérant qu'une analyse des ORF (open reading frame) a été réalisée mettant en évidence l'existence de 18 ORF potentielles dans l'insert pouvant générer plus de 50 acides aminés :

- 11 ORF n'ont pas d'homologies avec des régions codantes connues ;
- sur les 7 restantes, 3 ORF présentent des homologies de séquences avec le génome de la pomme de terre, une avec celle du phage M13, une avec un fragment⁴ de la polymérase d'un virus du riz ; seules l'ORF 1 et l'ORF 4 présentent des homologies significatives avec des séquences connues codant pour des résistances à des antibiotiques ;

Considérant que :

- l'ORF 4 présentent une homologie avec une séquence du gène de la protéine de résistance à la bléomycine (protéine de 126 acides aminés), du gène de l'ornithine cyclodéaminase d'*Agrobacterium tumefaciens* (protéine de 345 acides aminés) et d'une séquence de Tn5 (correspondant à 68 acides aminés) ;
- l'ORF 1 et l'ORF 4 sont cependant transcrites comme un seul ARN, mais l'existence de signaux de régulation procaryotiques rend improbable le fait que l'ORF4 soit exprimée comme une seule protéine dans la plante ;
- l'ORF 4 n'est exprimée, en effet, que sous l'action d'un promoteur bactérien, comme cela a pu être montré par ailleurs ;

Considérant qu'une ORF de 69 acides aminés a été identifiée à la jonction de la bordure droite de l'insertion avec le génome de l'hôte, qu'il n'y a pas de régions régulatrices qui pourraient conduire à la synthèse d'une protéine et que cette séquence putative ne présente aucune similarité avec des protéines ou des épitopes d'allergènes connus ;

² Dans son avis du 2 avril 2004, l'AESA a estimé qu'il n'existe aucun argument permettant d'interdire ou de limiter l'utilisation de gènes de résistance à la kanamycine, que ce soit dans le cadre d'expériences effectuées sur des champs ou à des fins de mise sur le marché.
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/384_en.html

³ PCR : Polymerase Chain Reaction

⁴ Les 25 premiers acides aminés (aa) de l'ORF sont homologues de la polymérase du RSSV (Rice Ragged Stunt Virus) qui elle, est constituée de 1357 aa.

(3) Informations relatives à l'expression des produits de gène

- (3.a) Considérant que la protéine GBSS, qui constitue 80 % des protéines extractibles dans la pomme de terre non génétiquement modifiée, n'a pas été mise en évidence dans la pomme de terre EH92-527-1, la construction introduite induisant bien le "silencing" du gène *gbss* ;
- (3.b) Considérant que des dosages du produit d'expression du gène *nptII* ont été réalisés par ELISA dans le tubercule frais et le tubercule bouilli, l'amidon, la pulpe et les feuilles de la pomme de terre EH92-527-1 à divers stades de développement de la plante ;

Considérant que les résultats obtenus montrent que :

- la protéine NPTII n'est pas détectable dans l'amidon et le tubercule bouilli (1 minute après ébullition),
 - elle représente, dans la pulpe et le tubercule frais, respectivement 0,00082 % et 0,00068 % de la fraction protéique de ces tissus,
 - au-delà de 58 jours de végétation, la quantité détectable dans les feuilles est inférieure à la limite de quantification ;
- (3.c) Considérant que la présence de la protéine codée par l'ORF 4 a également été recherchée en utilisant des anticorps fabriqués à partir d'une séquence synthétique issue du polypeptide de l'ORF4 et que les anticorps n'ont pu mettre en évidence le polypeptide (limite de sensibilité 1 ng sur 52 µg de protéines de feuilles) ;
- (5) Considérant que la stabilité de l'insertion a été vérifiée sur plusieurs générations de clones par une analyse la composition en amidon des tubercules pendant 3 années consécutives ;

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale liés à la pomme de terre génétiquement modifiée

- (7.1-3) Considérant que les données de composition chimique de la pomme de terre EH92-527-1, obtenues sur des échantillons représentatifs prélevés lors d'essais en champ réalisés en 1996 (3 sites avec 4 répétitions par site) ainsi que sur des essais additionnels réalisés de 1997 à 2000, ont été analysées et comparées statistiquement avec celles mesurées dans le clone parental non génétiquement modifié (variété Prevalent) et que les résultats font apparaître :
- une absence de variation de la composition en protéines, matière grasse, cendres, hydrates de carbone, fibres, amidon, énergie, glucose ;
 - des teneurs significativement supérieures en fructose, saccharose, vitamine C, nitrates et acide chlorogénique dans la pomme de terre EH92-527-1 mais qui ne sont plus significatifs lorsqu'on introduit la variable rendement dans l'analyse de covariance ;
 - une teneur comparable en glycoalcoïdes totaux, en solanine et en chaconine ;
 - une teneur significativement supérieure en calcium et en magnésium dans la pomme de terre EH92-527-1 ;

Considérant que des rendements en tubercules de la pomme de terre EH92-527-1, mesurés lors d'essais réalisés de 1998 à 2000, sont comparables au rendement moyen national (39 t/h de pomme de terre féculière) alors que l'essai réalisé en 1996 présentait une différence significative de rendement entre la pomme de terre modifiée et la variété témoin ;

- (7.4) Considérant que la pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1 a fait l'objet de nombreux essais en champ entre 1993 et 2001 sur 245 sites en Suède et qu'aucune différence de comportement agronomique (morphologie, sensibilité aux maladies ou aux traitements chimiques) n'a été observée par rapport à la variété témoin Prevalent ;

(7.5-6) Considérant qu'aucun traitement particulier est nécessaire pour l'extraction de l'amidon riche en amylopectine, l'amidon étant extrait par centrifugation puis séché et que la pulpe et les jus sont utilisés en l'état, compte tenu de leur faible teneur variable en eau ;

Considérant que les co-produits de la transformation de la pomme de terre-présentant les caractéristiques suivantes (tableau 1), seule la pulpe justifie son utilisation pour l'alimentation animale :

Tableau 1. Composition comparée de la pulpe, du jus et de l'eau de lavage de l'amidon.
Valeurs pour EH 92-527-1/ Témoin dans le produit frais .

Composant Produit	Matière sèche g/kg	Protéines g/kg	K g/kg	pH
Pulpe	350/360 et 130/150	13/14	4,5/4,2	6,0/6,0
Jus (/litre)	52/52	-	5,7/5,7	6,3/6,2
Eau lavage	1,1/1,3	-	0,12/0,12	7,3/7,3

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.a) Considérant que la protéine NPTII est présente en très faible quantité (tableau 2) seulement dans le tubercule cru et la pulpe ;

Tableau 2. Teneur comparée en protéines NPTII dans les divers produits de la pomme de terre féculière ng/g de poids frais.

Produit Evènement	Amidon	Pulpe	Tubercule		Feuille 43/78 jours
			Cru	Bouilli	
EH 92-527-1	ND	55	31	ND	1,8/Nd
Témoin : PdeT féculière	0	0	0	ND	Nd/0

ND Non détectable ; Nd détecté, non quantifiable.

Considérant le seuil de toxicité aiguë éventuelle de la protéine NPTII est supérieur à 5000 mg/kg de poids vif chez le rat (facteur de sécurité 10^{-6}) ;

Considérant que :

- dans un modèle fluide gastrique simulé, la dégradation de la protéine pure NPTII est obtenue en quelques minutes ;
- dans une étude *in vitro* en présence de fluide ruminal prélevé sur mouton adulte fistulé, la dégradation de la protéine pure NPTII est totale au bout de 4 heures même aux concentrations les plus élevées de 100 ng/ml correspondant à plusieurs milliers de fois la concentration théorique ;

(7.8.d) **Etude de toxicité chez l'animal de laboratoire**

Considérant que les effets d'une consommation de pomme de terre portant l'évènement EH92-52, comparés à ceux d'une consommation de la variété témoin Prévalent, ont été évalués chez le rat pendant 90 jours (10 mâles et 10 femelles par traitement dont un groupe ne recevant pas de pomme de terre) par introduction de 5 % de pomme de terre crue lyophilisée (90 % de matière sèche) à la ration journalière des animaux ;

Considérant que la composition chimique (10 composants primaires, 8 acides gras, 2 glycoalcaloïdes) des trois types de rations alimentaires a été déterminée et que les analyses n'ont pas montré de différence de composition ;

Considérant que la quantité d'aliment ingéré et les performances de croissance des animaux ont été régulièrement mesurées, qu'une batterie de tests visant à évaluer l'activité motrice des animaux a été appliquée à la fin de l'étude, que des paramètres urinaires, sanguins et de chimie clinique ont été mesurés à la fin de la période d'administration et que des examens macroscopiques des organes (poids frais) et des examens histopathologiques sur 18 organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant qu'aucun paramètre observé ne diffère significativement entre les rats témoins et ceux recevant l'aliment contenant la pomme de terre EH92-527-1 ;

Etude d'alimentarité chez l'animal cible

Considérant que la pulpe, destinée aux ruminants, est consommée de préférence par la vache, celle-ci constitue le seul animal sur lequel un essai de tolérance/toxicité est possible ;

Considérant qu'une étude a été réalisée sur 32 génisses en croissance (16 animaux par traitement) nourries pendant 20 semaines selon un dispositif expérimental en carré latin inversé (8 semaines d'expérience avec le produit issu de l'événement EH92-527-1 suivies de 8 semaines avec le produit témoin et 4 semaines de régime de base, et l'inverse pour les 16 autres génisses) ;

Considérant qu'une analyse détaillée de la ration expérimentale (représentée par 31-32 % de la matière sèche sous forme de pulpe) et de la ration complémentaire est présentée ;

Considérant que les performances zootechniques, notamment le gain de poids, ne sont pas affectées significativement ($P = 0,61$ à $0,74$) et que l'état de santé caractérisé par l'importance des refus, la fonction de digestion et la fluidité de la bouse n'est pas modifié par le traitement,

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que la comparaison des séquences d'acides aminés de la protéine NPTII avec celle des allergènes connus permet d'écarter l'allergénicité de la protéine NPTII ;

Considérant qu'il convient de noter que les données disponibles (résultats de dégradation *in vitro* de la protéine NPTII et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, pour conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique mais, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine ;

Considérant que la protéine putative codée par l'ORF 4 ne présente pas d'homologie de séquence d'acides aminés avec celle d'allergènes connus ;

Considérant que l'amidon, utilisé dans de nombreuses applications alimentaires, n'est pas connu pour induire des effets allergiques et que l'amidon dérivé de la pomme de terre EH92-527-1, qui sera hautement purifié avant son utilisation en alimentation humaine, ne devrait pas présenter un risque différent de l'amidon issu d'une pomme de terre conventionnelle ;

(7.10) Considérant que l'amidon issu de la pomme de terre EH 92-527-1 ne diffère de la fécule de pomme de terre féculière témoin (variété parente Prévalent) que par son taux d'amylopectine ;

Considérant que, bien que la pomme de terre féculière ne soit pas destinée à être consommée en l'état par l'homme, l'ensemble des résultats présentés ne met pas en évidence de différence entre la pomme de terre EH 92-527-1 et la variété témoin Prévalent, sinon par son seul taux d'amylopectine ;

Considérant les résultats de composition chimique, d'analyse des co-produits et de l'étude d'alimentarité réalisée avec des génisses en croissance ne mettent pas en évidence un risque nutritionnel pour les ruminants consommant de la pulpe de pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les données fournies dans le dossier initial relatives à l'analyse de la construction génétique et à l'analyse de la présence de la protéine NPTII dans divers tissus et produits de la pomme de terre, permettent d'écarter un éventuel risque sanitaire lié à la consommation :

- par l'homme, de produits de transformation de la pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1 ou de cette pomme de terre elle-même si elle était ingérée de façon accidentelle ;
- par l'animal, de co-produits dérivés de la transformation de la pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1.

Pascale BRIAND