

Maisons-Alfort, le 1<sup>ER</sup> octobre 2008

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande de renouvellement des autorisations de mise sur le marché des cotonniers génétiquement modifiés MON 1445, tolérant au glyphosate, pour l'utilisation des additifs et arômes dérivés en alimentation humaine et de tous dérivés en alimentation animale, au titre du règlement (CE) n°1829/2003..

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) a été saisie le 31 juillet 2008 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande de renouvellement des autorisations de mise sur le marché des cotonniers génétiquement modifiés MON 1445, tolérant au glyphosate, pour l'utilisation des additifs et arômes dérivés en alimentation humaine et de tous dérivés en alimentation animale, au titre du règlement (CE) n°1829/2003.

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) 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'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'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 8 septembre 2008, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant :

#### (A) Information générale

La demande a pour objet un avis sur le renouvellement des autorisations de mise sur le marché des additifs et produits dérivés des cotonniers portant l'événement de transformation MON1445, à savoir :

- ✓ l'huile de graine de cotonnier qui avait reçu une autorisation de commercialisation le 19 décembre 2002 au titre du règlement (CE) n°258/97 ;
- ✓ les additifs et arômes pour l'alimentation humaine ;
- ✓ tous les dérivés pour l'alimentation animale.

Les deux derniers types de produits n'étaient pas couverts par une réglementation spécifique avant la mise en place du règlement CE N°1829/2003.

Les cotonniers MON1445 avaient été examinés en 1998 par le Comité Scientifique des Plantes (SCP). Les hybrides issus du croisement conventionnel des cotonniers MON1445 et MON531, d'une part et des cotonniers génétiquement modifiés MON 1445 et MON15985, d'autre part ont fait l'objet de deux avis de l'AFSSA relatifs à des demandes d'autorisation de mise sur le marché pour l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (avis du 16 septembre 2005 et du 6 décembre 2005).

Les cotonniers MON 1445 sont tolérants au glyphosate par introduction du gène *cp4 epsps* provenant d'une souche d'*Agrobacterium*.

#### (C) Informations relatives à la modification génétique

La transformation a été effectuée sur la variété de cotonnier Coker 312 en utilisant une souche d'*Agrobacterium* possédant un plasmide Ti désarmé. Le vecteur portant l'ADN à transférer est PV-GHGT07, un plasmide binaire. Il comporte dans l'ordre : la bordure droite

du T-DNA, la cassette d'expression du gène *CP4epsps*, le gène *aad*, la cassette d'expression du gène *nptII*, l'origine de répllication (ori-V) permettant la répllication chez *Agrobacterium*, une cassette d'expression du gène *gox*, le gène *rop* participant au contrôle de la répllication, l'origine de répllication de pBR322.

Les cassettes pour une expression dans les plantes sont :

- ✓ la cassette **CP4epsps** constituée du gène *CP4epsps* sous sa forme optimisée dans le contexte végétal, du promoteur du virus de la mosaïque de scrofulaire (FMV), de la séquence codant le peptide de transit pour une localisation chloroplastique provenant du gène *epsps* d'*Arabidopsis thaliana*, de la séquence de terminaison correspondant à la région 3' non traduite du gène de pois de la sous unité E9 de la Rubisco.
- ✓ la cassette **nptII** constituée du gène bactérien *nptII*, du promoteur 35S du virus CaMV et de la séquence de terminaison 3' *nos* du gène de la nopaline synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

**(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée**

- (1)** Les protéines exprimées dans les cotonniers MON1445 sont l'enzyme de type 5-Enol Pyruvyl Shikimate-3-Phosphate Synthétase ( CP4 EPSPS) qui confère la tolérance au glyphosate et la néomycine phosphotransférase de type II (NPTII), qui inactive en les phosphorylant les antibiotiques de la famille des amino-glycosides. Le gène *nptII* provenant du transposon Tn5 a été utilisé pour permettre la sélection initiale des plantes transformées. Ce gène a été classé dans le groupe 1, selon l'avis de l'AESA<sup>1</sup>, sa présence dans les plantes génétiquement modifiées ne constitue pas un risque pour l'environnement, pour la santé humaine et animale.

La protéine CP4EPSPS (47.6 Kda, 455 acides aminés) provient d'un gène d'*Agrobacterium* sp souche CP4, une bactérie commune du sol. Il s'agit d'une EPSPS impliquée dans la voie de l'acide shikimique qui conduit à la biosynthèse des acides aminés aromatiques. En présence de glyphosate, l'enzyme est inhibée et une réduction des acides aminés aromatiques conduit à la mort de la plante. La CP4 EPSPS est fonctionnellement identique à la protéine endogène mais n'est pas inhibée par le glyphosate car elle présente une affinité plus faible pour ce composé. Son expression permet la production d'acides aminés aromatiques même en présence de glyphosate. Ce gène est employé dans d'autres espèces végétales génétiquement modifiées (soja round-up ready) ainsi que dans le cotonnier MON88913.

Des hybridations de type Southern ont été réalisées avec 5 sondes couvrant l'ensemble de l'ADN-T et 3 sondes couvrant le reste du vecteur PV-GHGT07. Ces hybridations ont porté sur l'ADN génomique extrait de feuilles provenant de MON 1445 et de la variété témoin Coker 312. Pour certaines hybridations, le plasmide PV-GHGT07 a été remplacé comme cible ou comme sonde par PV-GHGT06, identique pour son ADN-T, mais plus petit car ne possédant pas la région *gox*.

Les hybridations de type Southern montrent qu'une seule copie de l'ADN-T a été transférée en un locus du génome de MON 1445.

L'insert intégré dans le génome du cotonnier comprend l'intégralité des cassettes d'expression des gènes *cp4epsps* et *nptII* (décrites précédemment), et comporte en plus des gènes d'intérêt (agronomique et sélection de la transformation), le gène *aad* de résistance à la streptomycine ainsi qu'une portion de l'origine de répllication fonctionnelle chez *Agrobacterium* (*OriV*).

<sup>1</sup> Group I: It is therefore extremely unlikely (if at all) that the presence of these antibiotic resistance genes in the genome of transgenic plants will change the already existing bulk spread of these antibiotic resistance genes in the environment or will impact significantly on human and animal health (EFSA 2004).

Group II : should be restricted to field trial purposes and should not be present in GM plants to be placed on the market. Experimental releases of GM plants (according to part B of Directive 2001/18/EC) are generally confined, being limited in time and space. GM plants in experimental releases are not intended for use in foods or feeds.

Le gène *aad* code une aminoglycoside-adényl transférase permettant sa sélection en culture bactérienne dans un milieu contenant de la streptomycine ou de la spectinomycine. Ce gène est classé dans le groupe II par l'AESA en raison de l'importance d'utilisation de la streptomycine et spectinomycine en médecine humaine. Les gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques du groupe II doivent être restreints aux essais expérimentaux en champs et ne devraient plus être présents dans des plantes génétiquement modifiées destinées à être placées sur le marché selon l'avis de l'AESA<sup>1</sup>.

La région *gox* et l'origine de réplication chez *E. coli* (*ori-PBR322*) ne sont pas présentes dans le génome de MON 1445.

La construction insérée a été entièrement séquencée de même que les régions du génome en bordures de l'insertion sur seulement 172 nucléotides en 5' de l'ADN-T et 125 nucléotides en 3' de l'insertion. La comparaison des séquences montre que l'ADN-T inséré dans le génome de MON 1445 est identique à celui porté par le plasmide PV-GHGT07.

La séquence des régions du génome de l'évènement MON 1445 adjacentes à l'insertion a été comparée à celle d'une lignée parentale de cotonnier, DP5415. Il est à noter que seulement 297 nucléotides ont été comparés. Une délétion de 67 nucléotides et une insertion d'un nucléotide dans le génome du cotonnier, au niveau de l'insertion en 3', ont été observées.

Une analyse bioinformatique réactualisée en 2008 montre qu'au lieu de l'insertion, les séquences ne sont pas connues et qu'aucun gène ne semble interrompu. Cependant, sur une si courte séquence, rien ne permet d'exclure l'hypothèse que l'insertion ne se soit faite dans une région intronique d'un gène.

Une deuxième analyse bio-informatique des séquences de jonction entre l'insert et l'ADN de la plante en 5' (sur 121pb) et en 3' (sur 360pb) a été réalisée pour s'assurer que la séquence nouvellement créée par l'insertion ne pouvait donner lieu à la synthèse d'un peptide présentant un risque sanitaire. Les ORFs (phases de lecture ouverte) putatives ont été recherchées et leurs séquences ont été comparées aux séquences présentes dans les banques d'allergènes et de toxines. Les résultats montrent que ces ORF putatives ne présentent pas d'homologie de séquence avec les protéines toxiques et/ou allergènes répertoriées dans les bases de données.

On peut regretter, toutefois, que l'ensemble de ces analyses, bien que réactualisées en 2008, ait été conduit sur des séquences aussi courtes.

### (3) Informations relatives à l'expression des produits du transgène

Les cotonniers MON1445 ont été génétiquement modifiés pour exprimer les protéines CP4EPSPS et NPTII. Etant donné la présence du gène procaryote *aad* dans leur génome, et bien que le promoteur de ce gène ne permette pas une expression dans les cellules végétales, la présence de la protéine AAD dans les tissus des cotonniers a également été recherchée. Ainsi les protéines CP4EPSPS, NPTII et AAD ont été dosées quantitativement par la méthode ELISA dans les feuilles au stade végétatif et dans les graines à maturité. Les échantillons proviennent de cotonniers MON1445 et témoins cultivés sur six sites aux États-Unis en 1993 et 1994.

La protéine AAD n'est détectée dans aucun tissu.

**Tableau 1** : valeurs moyennes de protéines recombinantes exprimées en µg/mg de poids Frais, ( ) année de production des échantillons

Protéines	Feuilles (1993)	Graines (1993)	Feuilles (1998)	Graines (1998)
CP4 EPSPS	0,052	0,082	0,036	0,255
NPTII	0,045	0,0067	0,03	0,03

Les données d'expression ont été réactualisées et de nouvelles expériences ont été menées sur les mêmes tissus en 1998, 1999 et 2001. Les nouvelles valeurs mesurées en 1998-2001 sont plus élevées (tableau 1) qu'en 1993-1994.

Les protéines CP4EPSPS et NPTII ont également été quantifiées dans les produits dérivés tels que la farine et le tourteau. Les quantités moyennes mesurées sont respectivement de 0,07µg/mg et 0,001 µg/mg (qui correspond à la limite de détection) (quantification par Western).

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

La transmission de l'insert a été étudiée au cours de 5 générations de backcross. Les résultats montrent une ségrégation de type Mendélien et les analyses par Southern confirment que l'insertion a eu lieu dans le génome nucléaire.

La stabilité de l'expression a été montrée par détection de CP4 EPSPS révélée par la technique ELISA sur 5 générations et par la stabilité du phénotype de résistance au glyphosate dans les variétés commercialisées et cultivées depuis 1997.

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

**(7.1.3)** Deux études de l'analyse de la composition chimique ont été conduites sur des échantillons de plantes cultivées dans 6 états des Etats-Unis en 1993 et en 1994. L'étude de 1993 a porté sur la graine de coton et les composants comparés sont les paramètres proximaux (teneur en protéines, lipides, cendres, hydrates de carbone, calories et humidité), 18 acides aminés et 14 acides gras. Ces analyses ont été complétées par la comparaison des niveaux de gossypol dans les graines et de gossypol et d'autres substances allélochimiques dans les feuilles.

L'étude de 1994 a porté sur la graine de coton et les composants comparés sont les mêmes que précédemment. Des données comparant les graines de cotonnier MON1445 traité au glyphosate à celles provenant du témoin Coker312 (génotype initialement transformé) sont aussi fournies.

Une analyse de la composition en acide gras (14) a été réalisée sur l'huile raffinée et complétée par la mesure de la teneur en gossypol et la recherche des protéines recombinantes (CP4EPSPS, NPTII) dans l'huile.

Les résultats de l'analyse statistique ne montrent aucune différence de concentration sur la plupart des composés mesurés. On note une teneur en lipides totaux et en acide myristique légèrement plus élevée dans les graines de cotonnier issues de MON1445 traité par le glyphosate. Toutefois aucune différence n'est observée dans les échantillons provenant de plantes non traitées. L'analyse de la composition de l'huile n'a révélé aucune différence entre l'huile issue de MON1445 et celle issue du témoin Coker312.

La teneur en protéine recombinante a été mesurée dans l'huile et dans les fibres des cotonniers transformés et les résultats montrent que les deux protéines CP4EPSPS et NPTII ne sont pas détectables dans l'huile. Dans les fibres, seule CP4EPSPS est détectée à hauteur de 0,5 µg/g de protéines totales.

**(7.5) Spécification des produits 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.

**(7.7) Utilisation et consommation prévue**

Les cotonniers MON1445 sont destinés à tous les modes de consommation chez l'homme et l'animal comme les cotonniers conventionnels.

**(7.8) Toxicologie**

**(7.8.1)** La sécurité des protéines CP4 EPSPS et NPTII a déjà été évaluée à plusieurs reprises et les protéines ont fait l'objet :

- d'une étude de toxicologie aiguë chez la souris, chez qui aucun effet toxique aigu n'a été observé,

- de tests de digestion protéolytique *in vitro* qui montrent que ces protéines sont rapidement dégradées,

La protéine CP4 EPSPS est très similaire en terme de séquence primaire, d'homologie des résidus du site actif et de structure tridimensionnelle, aux EPSPS exprimées naturellement dans les plantes et les microorganismes présents dans l'alimentation humaine et animale.

Des analyses bioinformatiques sur la séquence des protéines CP4EPSPS et NPTII montrent que celle-ci ne présentent pas d'homologie avec des séquences connues de peptides toxiques.

#### **(7.8.2) Etude de la toxicité sub-chronique**

Aucune donnée de toxicologie sur l'animal n'est disponible, les cotonniers MON 1445 n'ont pas fait l'objet d'une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours chez le rat.

Toutefois, les données fournies de production, d'importation, de consommation et d'exposition dans le monde et en Europe permettent de se dispenser d'une telle étude.

#### **(7.9) Allergénicité**

L'évaluation de l'allergénicité, qui a été réactualisée dans le présent dossier, repose sur les éléments suivants :

- ✓ les organismes donneurs des protéines ne sont pas connus pour être à l'origine d'allergènes ;
- ✓ la recherche d'identités de séquence entre la protéine CP4EPSPS et NPTII et les protéines connues pour être allergènes n'a pas mis en évidence de telles identités ;
- ✓ la digestion rapide *in vitro* de ces protéines en milieu gastrique ou intestinal simulé ;
- ✓ la faible teneur ou l'absence des protéines considérées dans les produits destinés à la consommation

Il convient de noter que ces données ne suffisent pas, pour autant, à 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.

#### **(7.10) Evaluation nutritionnelle**

Une étude d'alimentarité a été réalisé sur un total de 200 poissons chats nourris avec du tourteau de coton (20 % de la ration alimentaire) pendant 10 semaines afin de comparer les effets d'une consommation de tourteau issu des cotonniers MON 1445 avec les effets d'une consommation de tourteau issu de la variété témoin Coker312 (2 traitements, avec 5 répétitions et 20 animaux).

L'analyse de composition des deux régimes (matière sèche, protéines brutes, matière grasse, cendres) ne met pas en évidence de différence.

La comparaison des effets repose sur l'analyse de 4 paramètres zootechniques et de 4 paramètres mesurés sur les filets des animaux abattus à l'issue de l'expérimentation.

Aucun effet n'a été observé sur la survie des animaux (1 mort par traitement). La croissance et l'efficacité alimentaire des poissons nourris avec MON 1445 ne diffèrent pas significativement de celles mesurés chez les animaux nourris avec la variété témoin

### Conclusion de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Le dossier technique transmis pour le renouvellement des produits dérivés des cotonniers portant l'événement MON1445 a été réactualisé.

Cette réactualisation complète les analyses bioinformatiques des séquences génomiques et des séquences aux lieux de jonction 5' et 3' de l'insertion MON1445. Elle confirme aussi les aspects de sécurité des deux protéines exprimées.

Ce dossier comprend également des données de production, d'importation, de consommation et d'exposition dans le monde et en Europe.

Cependant, comme c'est le cas pour les cotonniers MON531, les cotonniers MON1445 comportent dans leur génome des séquences d'origine bactérienne inutiles à l'expression du caractère agronomique recherché. Parmi elles, le gène *aad* de résistance à la streptomycine/spectinomycine, ne devrait pas être présent dans les plantes génétiquement modifiées, mises sur le marché pour l'alimentation humaine et animale<sup>2</sup>.

**Par conséquent, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère qu'au regard des textes communautaires la mise sur le marché de ces produits ne devrait plus être autorisée.**

**Mots clés :** OGM, renouvellement, cotonnier MON1445, tolérance au glyphosate

**La Directrice Générale**

**Pascale BRIAND**

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
94701

Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

<sup>2</sup> EFSA 2004, Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants, EFSA Journal, 48, p.1-18.

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