

Maisons-Alfort, le 25 novembre 2005

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un cotonnier
génétiquement modifié LLCotton25 tolérant à un herbicide pour l'importation et
l'utilisation en alimentation humaine et animale de graines et de produits dérivés,
au titre du règlement (CE) n° 1829/2003**

LA DIRECTRICE GENERALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 12 septembre 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 d'un cotonnier génétiquement modifié LLCotton25 tolérant à un herbicide pour l'importation et 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-2005-13).

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 17 novembre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

La présente demande a pour objet la mise sur le marché d'un cotonnier portant l'événement de transformation LLCotton25, obtenu par l'introduction du gène *bar* codant l'enzyme phosphinotricine acétyl transférase PAT conférant la tolérance à un herbicide, le glufosinate d'ammonium.

Ce coton est destiné à être utilisé en alimentation humaine (huile et cellulose) et en alimentation animale (tourteaux).

Le cotonnier *Gossypium hirsutum* appartient au genre *Gossypium* dont les espèces sont diploïdes ou allotétraploïdes. Les graines de cotonnier contiennent deux types de composés potentiellement toxiques : le gossypol, qui est un terpénoïde, et des acides gras cyclopropénoïdes. Le gossypol est détaché dans le rumen par combinaison avec des protéines. Aussi, les graines ou les tourteaux de cotonnier sont utilisables en alimentation animale des bovins et à plus faible dose chez certains monogastriques.

(C) Informations relatives à la modification génétique

(1) Des tissus du cotonnier *Gossypium hirsutum* (variété Cocker312) ont été mis en contact avec une souche désarmée d'*Agrobacterium* portant un vecteur de transformation fonctionnant en système binaire (l'ADN-T est sur le vecteur de transformation tandis que les fonctions de virulence permettant son transfert sont codées par un plasmide Ti lui-même dépourvu d'ADN-T).

(2) Considérant que l'ADN-T de 2319 pb porté par le vecteur de transformation pGSV71 comporte les éléments suivants :

- la bordure droite de l'ADN-T

- le promoteur 35S du virus CaMV,
- le gène *bar* originaire de *Streptomyces hygroscopicus*,
- le terminateur *NOS* du gène codant la nopaline syntase d'*A. tumefaciens*,
- la bordure gauche de l'ADN-T ;

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

Considérant que les analyses de type Southern, réalisées avec plusieurs sondes correspondant aux différentes parties de l'ADN-T, à partir de l'ADN de la lignée parentale Cocker312, du cotonnier LLCotton25 et du plasmide vecteur, et l'analyse des séquences de l'insertion et de ses régions bordures montrent que :

- il y a une insertion unique sans présence d'ADN du vecteur et que les séquences introduites ne sont présentes qu'à un seul exemplaire ;
- la séquence de l'ADN-T de la plante est identique à celle du fragment porté par le plasmide vecteur, à l'exception de la délétion des 23 pb de la bordure gauche (côté 5') et de 4 pb dans la séquence de la bordure droite (côté 3') ;
- les 677 pb de la région 5' et les 412 pb de la région 3' appartiennent au génome de la plante et que la comparaison des séquences bordures de part et d'autre de l'insertion avec celle de l'ADN de la plante témoin met en évidence une perte de 38 pb dans le génome de la plante au site d'insertion ;

Considérant que l'analyse informatique des séquences de bordure et du transgène met en évidence 26 ORF (cadre de lecture ouverte) possibles, basée sur la recherche d'éléments promoteurs (CAAT et TATA), de séquence poly A et de région NUE (near upstream element) ainsi que de coton ATG en situation permettant une traduction, et que sur ces 26 ORF, les ORF-6, ORF-7 et ORF-8, localisées à la jonction du côté 3' entre l'ADN de la plante et l'ADN-T, présentent des homologies limitées (1,8 %, 1,4 %, et 5,3 % respect.) avec des séquences de protéines de phytopathogènes ; il est hautement improbable que de si petits fragments, s'ils étaient traduits, codent pour des protéines fonctionnelles ; aucun ORF n'était dans une situation favorable pour permettre leur transcription et leur traduction ;

Considérant que la comparaison de ces peptides putatifs avec des séquences d'acides aminés figurant dans différentes bases de données n'a pas mis en évidence d'homologie avec des peptides connus pour présenter des effets toxiques, immunologiques ou allergéniques ou avoir une activité pharmacologique ;

Considérant que cette analyse informatique des séquences n'a pas mis en évidence de protéines de fusion ; elle montre que l'insertion n'a pas eu lieu dans une région codante et qu'elle n'interrompt pas de séquences régulatrices ;

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

Considérant que la teneur en protéine PAT a été évaluée dans différents organes de la plante par la méthode ELISA et que les résultats montrent (tableau) que le gène *bar* s'exprime préférentiellement dans les parties aériennes, notamment dans les feuilles et les tiges (0,74 % des protéines totales extractibles):

Tableau : Teneur moyenne en protéine PAT dans différentes parties de la plante LLCotton25

Matrice	Teneur moyenne en protéine PAT (µg/g pf) ± ET	Fourchette de teneurs en protéine PAT (µg/g pf)	% PTE* (mg/g pf)	Teneur en protéine PAT (% of PTE)
Racines	7,97 ± 1,86	5,63 – 10,1	2,26	0,35
Tiges	36,8 ± 6,7	34,3 – 45,5	4,99	0,74
Feuilles	52,9 ± 6,0	45,1 – 57,3	7,13	0,74
Graines	69,9 ± 6,0	61,3 – 74,1	116	0.061
Pollen	19,3 ± 39,2	0,11 – 170	107	0.018

* PTE Protéines Totales extractibles

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

Considérant que la stabilité de l'insertion a été vérifiée (Southern blot) en comparant l'ADN extrait de plantes LLCotton25 jusqu'à la 6^{ème} génération, obtenues par croisement conventionnel ou par autopollinisation, cultivées dans différentes conditions environnementales et de l'ADN extrait de différentes variétés portant l'événement LLCotton25, et que les résultats montrent que la séquence introduite est stable et transmise intégralement dans les descendants ;

Considérant que le phénotype de tolérance au glufosinate est transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant ;

(7) Informations relatives aux effets toxiques, allergiques, et autres effets délétères pour la santé humaine et animale**(7.1-3) Considérant que la composition chimique de la graine et des produits transformés (tourteau et huile raffinée) du cotonnier LLCotton25 a été comparée à celle de la variété témoin Coker312 et à celle de variétés commerciales ; une cinquantaine de composants ont été analysés sur des échantillons récoltés aux Etats-Unis en 2000 et 2001 sur 15 sites (3 répétitions par site) dont 3 communs aux deux années : fibres totales, cendres, carbohydrates totaux, protéines, acides aminés, lipides totaux, acides gras, vitamine E, phosphore, ions potassium, magnésium, fer, calcium et zinc, éléments toxiques ou antinutritionnels : gossypol, acides gras cyclopropénoïdes et acide phytique ;**

Considérant que les résultats obtenus ont fait l'objet de différents traitements statistiques qui permettent d'identifier des effets qui seraient liés à la plante OGM (traitée au glufosinate et non traitée) par rapport au témoin, à la localisation et à la saison ;

Considérant que :

- quelques différences statistiquement significatives ($p < 0.05$) sont observées entre les valeurs mesurées chez le témoin et chez le cotonnier LLCotton25 pour l'acide dihydrosterculique et le calcium mais ces valeurs restent dans la fourchette des valeurs de la littérature,
 - les teneurs en gossypol et en acides cyclopropénoïdes ne sont pas différentes entre le cotonnier témoin et le cotonnier LLCotton25 dans les graines et le tourteau, et la teneur en gossypol total est inférieure à la limite de détection dans l'huile raffinée ;
- ces résultats permettent de considérer que le cotonnier LLCotton25 présente une composition chimique équivalente à celle du cotonnier témoin non génétiquement modifié Coker312, notamment en ce qui concerne le profil lipidique de l'huile de coton raffinée ;

(7.4) Caractéristiques agronomiques

Considérant que les caractéristiques agronomiques de différentes variétés de cotonnier LLCotton25 cultivées sur plusieurs années et plusieurs localisations ont été évaluées par comparaison avec celles de la lignée parentale Cocker312 et de lignées commerciales cultivées dans les mêmes conditions agronomiques, climatiques et saisonnières et que les résultats ne mettent pas en évidence de différences entre les variétés LLCotton25, la lignée parentale Cocker312 et les autres variétés commerciales ;

(7.6) Effet du procédé de traitement

Considérant qu'après application du procédé de traitement des graines de cotonnier :

- la protéine PAT n'est plus détectée mais des traces d'ADN peuvent être encore présentes dans l'huile de coton brute,
- ni ADN ni protéine PAT ne sont détectables dans l'huile de coton raffinée destinée au consommateur ;

(7.8) Toxicologie

Considérant que les résultats d'une étude de toxicité aiguë, réalisée chez des souris à qui une dose unique de la protéine PAT (10 mg/kg p.c.) a été administrée par voie intraveineuse, n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes ni de mortalité après 15 j d'observations ; il convient de noter que de nombreuses études de toxicité aiguë ont été

réalisées par voie orale avec la protéine PAT et qu'il n'a jamais été mis en évidence d'effet néfaste (dose sans effet supérieure à 5000 mg/kg p.c.) ;

Considérant que la protéine PAT codée par le gène *bar* est dégradée en moins de 30 secondes dans un milieu gastrique simulé et en 5 minutes dans un milieu intestinal simulé ;

Considérant que l'équivalence structurale et fonctionnelle de la protéine PAT codée par le gène *bar* extraite de la plante LLCotton25 et la protéine PAT extraite d'*E.Coli* a été vérifiée par analyse SDS-Page et Western blot, et qu'elle n'est pas glycosylée ;

Considérant que la séquence du gène *bar* de LLCotton25 présente des homologies de séquences uniquement avec des séquences de gènes codant des acétyltransférases et que la séquence de la protéine PAT codée par le gène *bar* ne présente pas d'homologies de séquences avec des protéines répertoriées dans les bases de données connues pour avoir des propriétés toxiques ;

Considérant cependant qu'il serait nécessaire de disposer d'une étude de toxicité subchronique chez le rat nourri avec des produits issus du cotonnier LLCotton25 pour exclure la survenue d'effets toxiques inattendus liés à la modification génétique ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que les observations suivantes ne permettent pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de la protéine PAT codée par le gène *bar* dans le cotonnier LLCotton25 :

- la protéine PAT exprimée dans le coton n'est pas glycosylée ;
- les tests de digestion protéolytique en fluides gastrique et intestinal simulés montrent qu'elle est rapidement dégradée ;
- les séquences des acides aminés de la protéine PAT ne présentent pas de similitude avec des séquences (8 acides aminés contigus) de protéines connues pour être allergènes ou immunologiquement actives ;

Considérant qu'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, 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 ;

(7.10) **Evaluation nutritionnelle de l'hybride**

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée chez le poulet (560 poulets, 140 animaux par traitement, soit 14 répétitions avec 7 mâles et 7 femelles par répétition) nourri pendant 33 jours avec 10 %/kg de tourteau de cotonnier LLCotton25 traité et non traité à l'herbicide, en comparaison avec des poulets nourris dans les mêmes conditions avec un tourteau de cotonnier Cocker312 témoin et d'une variété commerciale ;

Considérant que les résultats portent sur 4 paramètres zootechniques: mortalité, gain de poids, consommation alimentaire et taux de conversion et sur des analyses des différentes parties de la carcasse pour estimer leurs valeurs transformées ;

Considérant que l'analyse de composition (incluant la recherche de mycotoxines et de métaux) des différents régimes destinés aux poulets confirment les données mesurées dans l'étude de composition présentée au point 7.1-3 ; l'analyse des régimes incluait la recherche de mycotoxines, de pesticides de métaux et la qualité microbiologique ;

Considérant qu'on n'observe aucune différence due aux traitements pour ce qui concerne les performances pondérales, la consommation d'aliment, l'efficacité alimentaire, le taux de survie des oiseaux et qu'à l'issue de l'expérience, on observe pas non plus de différences en ce qui concerne les données relatives aux caractéristiques de la carcasse (5 paramètres disponibles),

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que pour s'assurer que les produits issus du cotonnier LLCotton25 présentent le même niveau de sécurité sanitaire que les produits issus d'un cotonnier conventionnel, il conviendrait de disposer une étude de toxicité subchronique 90 jours chez le rat nourri avec de l'huile produite à partir de ce cotonnier génétiquement modifié.

Pascale BRIAND