



Maisons-Alfort, le 18 janvier 2008

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 MON 88913, tolérant au glyphosate, pour l'importation
et la transformation de grains ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et
animale de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 6 novembre 2007 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 MON 88913, tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de grains ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de ses produits dérivés, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2007-41).

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, 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'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 15 janvier 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. Les produits issus de la graine du cotonnier sont destinés à être utilisés en alimentation humaine (huile) et animale (tourteau de graine de cotonnier).

La présente demande porte sur la mise sur le marché d'un cotonnier génétiquement modifié MON 88913, tolérant au glyphosate, pour l'importation et la transformation de grains 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.

Le cotonnier MON 88913 a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome deux copies en tandem du gène *cp4 epsps* codant pour la protéine CP4 EPSPS tolérante au glyphosate. La modification introduite dans MON88913 a pour effet d'augmenter la tolérance au glyphosate durant les stades tardifs du développement et permet un traitement glyphosate durant la phase de développement des graines.

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

Considérant que l'événement MON88913 a été produit par transformation avec une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* ABI portant le vecteur binaire désarmé PV-GHGT35. Les bactéries ont été co-cultivées avec des explants d'hypocotyl de cotonnier provenant de la germination *in vitro* de graines de cotonnier. MON88913 est le résultat de la régénération

d'un cal transformé, tolérant au glyphosate. L'ADN-T qui comporte 2 cassettes d'expression du gène *cp4 epsps* est constitué des éléments suivants :

- la bordure droite de l'ADN-T,
- un promoteur chimérique constitué de la séquence « enhancer » du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque de la scrofulaire (FMV) suivi du promoteur du gène *Tsf1* d'*A. thaliana* codant pour le facteur d'élongation EF-1 alpha d'*Arabidopsis thaliana*,
- la séquence leader et l'intron 1 (L-*Tsf1* et I-*Tsf1*) du gène *Tsf1* d'*Arabidopsis thaliana*
- la séquence (TS-*ctp2*) d'*Arabidopsis thaliana* codant pour un peptide d'adressage chloroplastique
- la séquence codante du gène de la protéine CP4EPSPS d'*Agrobacterium sp* souche CP4
- la séquence de terminaison du gène E9 codant pour la petite sous-unité de la ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase du pois (*pisum sativum*)
- le promoteur chimérique constitué de la séquence « enhancer » du promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) combiné au promoteur du gène *act8* d'*Arabidopsis thaliana*
- la séquence leader, l'intron 1 et l'exon 2 bordant (L-*act8* et I-*act8*) du gène *act8* d'*Arabidopsis thaliana*
- la séquence codante du gène *cp4 epsps* et les mêmes séquences (peptide de transit, terminaison, polyadénylation) que dans la cassette précédente
- la bordure gauche de l'ADN-T.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Le cotonnier portant l'événement de transformation MON88913 exprime la protéine CP4 EPSPS. Cette enzyme provient d'*Agrobacterium sp* souche CP4, une bactérie commune du sol et est moins sensible au glyphosate que les EPSPS endogènes des plantes. La plante transgénique est ainsi tolérante à l'herbicide. L'enzyme EPSPS (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) catalyse une réaction de la voie de l'acide shikimique qui conduit à la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Lorsque l'enzyme est inhibée, on observe une réduction des acides aminés aromatiques qui conduisent à la mort de la plante. Lorsque qu'une forme tolérante de la protéine est exprimée, l'activité de l'enzyme permet la production d'acides aminés aromatiques même en présence de glyphosate. Le gène *cp4 epsps* code pour une protéine de 47.6 KDa consistant à un polypeptide de 455 acides aminés. CP4 EPSPS est fonctionnellement identique à la protéine endogène mais présente une affinité plus faible pour le glyphosate (Padgett *et al.*, 1996). Ce gène est employé dans d'autres espèces végétales génétiquement modifiées (soja round up ready) ainsi que dans le cotonnier MON1445.
- (2) Considérant que des hybridations de type Southern ont été réalisées avec des sondes correspondant aux différentes parties du vecteur binaire, sur l'ADN de MON88913 et sur l'ADN de cotonnier témoin segregant négatif, hydrolysé par plusieurs endonucléases de restriction, que l'analyse de ces hybridations montre que MON88913 contient un seul fragment d'insertion et que ce fragment correspond à une seule copie de l'ADN-T issue du plasmide PV-GHGT35 ; qu'aucune autre séquence pouvant correspondre à l'ADN du vecteur de transformation PV-GHGT35 n'a été introduite dans le cotonnier MON88913 ;

Considérant que des amplifications PCR des régions 5' (1231pb) et 3' (1228 pb) bordantes de l'insert et des régions internes à l'insert ont été réalisées, que les fragments ont été séquencés et que les résultats ont montré une parfaite identité avec des séquences nucléaires du cotonnier ainsi qu'avec l'ADN-T du plasmide PV-GHGT35 (séquence complète de 8511 pb) mais qu'une délétion de 18 pb d'ADN génomique de cotonnier en amont de l'insertion a été observée ;

Considérant qu'afin de s'assurer qu'aucune nouvelle séquence n'a été créée par l'insertion, une étude bio-informatique complète a été réalisée pour rechercher la présence d'ORF (open reading frame) putatives dans les 6 cadres de lecture au niveau des régions de bordures de l'insert, et que 9 polypeptides de plus de 8 acides aminés ont été trouvés. La comparaison des séquences déduites de ces ORF putatives avec des séquences figurant dans des banques d'allergènes, de toxines, de motifs peptidiques, n'a pas mis en évidence

d'homologie significative entre ces peptides putatifs et des séquences connues répertoriées dans ces banques de données.

Considérant que l'intégration de l'évènement MON 88913 ne s'est pas faite dans une région codante ou fonctionnelle du génome du cotonnier et que les régions adjacentes de l'insertion ne présentent aucune homologie avec des séquences codant pour des protéines déjà décrites dans les bases de donnée (vérification par analyse bio-informatique) ;

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

Considérant que les teneurs en protéine CP4 EPSPS ont été mesurées par la méthode ELISA dans les feuilles à différent stade de développement, dans les racines, dans les graines et le pollen de cotonnier MON 88913 et de cotonnier témoin cultivé aux Etats-Unis sur 4 sites en 2002 et en Australie sur 4 sites en 2003-2004 ;

Considérant que la protéine CP4 EPSPS n'est pas détectée dans la plante contrôle ;

Considérant que les quantités mesurées dans les mêmes tissus aux Etats unis en 2002 et en Australie en 2003-2004 sont comparables et que l'expression la plus importante du produit du gène inséré est de 340 µg/g poids sec dans le grain ;

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

Considérant que la stabilité phénotypique a été vérifiée par Southern sur une génération de plantes hétérozygotes et une génération de plantes homozygotes notamment par détection de la protéine CP4EPSPS (test immunologique) ou évaluation de la tolérance au glyphosate ;

Considérant que les données obtenues confirment que le transgène présent dans le génome du cotonnier MON 88913 est présent en un seul locus et qu'il est stable ;

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

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

Considérant qu'une analyse de composition chimique a été réalisée à partir d'échantillons de graines de cotonnier MON88913, cultivés en 2002 aux Etats-Unis sur 4 sites en 2002 (4 répétitions par site), et comparée à celle d'échantillons provenant d'un cotonnier témoin (ségrégeant négatif) et de 16 variétés commerciales ;

Considérant que cette analyse a porté sur le grain pour les paramètres suivants : protéines totales, lipides totaux, cendre, humidité, fibres totales, fibres solubles dans des détergents acides et neutres, fibres diététiques totales, 18 acides aminés, 11 acides gras (C8-C22), 3 acides gras cyclopropénoïques, la vitamine E, 9 minéraux, et le gossypol (toxines naturelles des graines de cotonnier). La composition en oligosaccharides et les teneurs en énergie brute ont été déterminés par calcul ;

Considérant que l'analyse statistique (analyse de variance) des différents paramètres met en évidence quelques différences statistiquement significatives entre la graine de cotonnier MON88913 et son contrôle sur l'ensemble des sites de cultures mais que ces différences sont faibles et dans les limites des variations observées dans les graines de cotonnier des 16 variétés commerciales également testées.

Considérant que les résultats de l'analyse de composition de la graine montrent que les graines provenant de la variété de cotonnier MON 88913 ont une composition équivalente au graine témoin et provenant des variétés commercialisées y compris en ce qui concerne la teneur en gossypol ;

(7.4) **Analyse comparative des caractères agronomiques**

Considérant que l'analyse des caractères agronomiques et phénotypiques a été réalisée en 2002 sur 14 sites aux Etats-Unis comparait MON88913 et son témoin ségrégeant négatif et

que ces analyses montrent qu'il n'y a pas de différences entre les plantes de cotonnier génétiquement modifié et les plantes témoins ;

(7.6) Effet du procédé de traitement

Considérant que le cotonnier 88913 a les mêmes applications que les autres variétés de cotonnier, que les analyses de composition de la graine ont montré une équivalence entre le cotonnier 88913 et son témoin (segrégeant négatif) ainsi que les variétés commercialisées, l'analyse de la composition dans les produits dérivés n'est pas nécessaire ;

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Considérant que ce cotonnier a pour vocation à être utilisé sous tous les modes de consommation chez l'animal et chez l'homme ;

(7.8) Toxicologie

(7.8.1) Evaluation de la sécurité des protéines

Les niveaux de CP4 EPSPS exprimés dans la plante étant très faibles et insuffisants pour réaliser les essais de toxicité, la protéine a été clonée dans *E. coli* afin d'être produite en grande quantité. Il convient alors de démontrer l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine produite dans la plante et dans la bactérie.

Considérant que les protéines CP4 EPSPS extraite de la plante et produite par *E. coli* présentent,

- la même mobilité électrophorétique (SDS-Page) signifiant que les protéines ont le même poids moléculaire,
- la même immunoréactivité,
- les mêmes peptides de digestion trypsique (spectrométrie de masse MALDI TOF)
- la même séquence N-terminale
- la même activité enzymatique

l'équivalence fonctionnelle et biochimique de la protéine CP4 EPSPS synthétisée par *E. coli* et extraite du cotonnier MON88913 a été démontrée ;

Considérant que la protéine EPSPS est présente à l'état naturel dans de nombreuses variétés de plantes dont le soja et le maïs, des microorganismes, des champignons, des algues et des levures utilisées en boulangerie ;

Considérant que la protéine CP4 EPSPS a déjà été introduite dans différentes espèces végétales (soja, maïs, colza, cotonnier) ;

Considérant que la protéine CP4 EPSPS ne présente pas de similarité de structure avec des protéines, répertoriées dans des bases de données internationales, connues pour leurs propriétés toxiques, immunotoxiques ou leur activité biologique ou pharmacologique chez l'homme ;

Considérant qu'une étude de toxicité aiguë par voie orale (administration unique) a été réalisée chez la souris avec la protéine CP4 EPSPS, synthétisée par *E. coli*, et qu'à la dose maximale testée de 572 mg/kg p.c., la protéine CP4 EPSPS n'induit pas d'effets toxiques dans cette espèce sur l'ensemble des paramètres étudiés ;

Considérant qu'à partir de la dose sans effet néfaste de 4511 mg/kg p.c./j observée dans l'étude de toxicité subchronique 90 jours effectuée chez le rat, une marge de sécurité supérieure à 10^7 peut être calculée ;

(7.8.4) Etude la toxicité subchronique

Considérant que la graine de cotonnier MON 88913 a fait l'objet d'une étude de toxicité par administration répétée pendant 90 jours par voie orale chez le rat (120 animaux, 20 males et 20 femelles par traitement), que les animaux nourris avec un régime contenant 2 % ou 5 %

de graines de cotonnier MON 88913 sont comparés à un groupe témoin recevant 5 % de graine de cotonnier témoin ;

Considérant que les résultats obtenus sur les paramètres mesurés (observations cliniques, poids du corps, biochimie sanguine, hématologie, biochimie urinaire, poids des organes, histologie) mettent en évidence quelques modifications significatives notamment :

- une augmentation des réticulocytes à 13 semaines chez les mâles du groupe recevant du MON 88913 2 % sans que d'autres effets sur la lignée rouge et qu' aucun signe d'anémie n'ait été observé ;
- une augmentation significative des globulines et du cholestérol dans le groupe femelle MON 88913 5 %, sans augmentation parallèle des protéines totales ou de l'albumine, mais que les variations observées ne peuvent pas être reliées à la manifestation d'un effet toxique du MON 88913 et qu'elles sont sans signification toxicologique ;

Considérant que cette étude permet de déterminer une dose sans effet néfaste observé de 4004 mg/kg p .c./ jour chez le rat mâle et de 4511 mg/kg p.c./ jour chez le rat femelle ;

Considérant cependant qu'il n'est pas précisé si les graines utilisées dans l'évaluation des risques toxicologiques proviennent d'un cotonnier traité au glyphosate ;

(7.9) Allergénicité

Considérant que la recherche d'identité de séquence des acides aminés de la protéine CP4 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 ;

Considérant que les résultats du test de digestibilité de la protéine CP4 EPSPS (produite par *E. coli*) en milieu acide (fluide gastrique simulé contenant la pepsine) montrent que CP4 EPSPS est dégradée à plus de 90 % en 15 secondes (vérifié par électrophorèse SDS-PAGE, Western blot et test d'activité) :

Considérant qu'au regard des éléments suivants :

- ✓ l'absence de risque allergique de l'organisme source, *Agrobacterium*
- ✓ l'absence d'homologie de séquence de la protéine CP4 ESPS avec des allergènes connus,
- ✓ l'absence de glycosylation de cette protéine,
- ✓ le fait que la protéine CP4 ESPSP est rapidement hydrolysée par des milieux gastriques simulés,
- ✓ la très faible teneur en protéine CP4 ESPSP dans les aliments potentiels issus du cotonnier MON 88913
- ✓ aucun effet lié à la consommation de la protéine CP4 EPSPS en alimentation humaine depuis plus de 10 ans n'a été rapporté ;

l'existence d'un potentiel allergène lié à la consommation de la protéine CP4 EPSPS ne peut pas être suspectée ;

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

Considérant qu'une étude d'alimentarité a été réalisée chez le poisson-chat (600 animaux, 20 poissons par traitement, 5 répétitions) nourris pendant 8 semaines par des granulés de nourriture contenant 20 % de tourteaux de cotonnier de MON88913 ou de cotonnier témoin (le ségrégeant négatif) ou de 4 autres variétés de cotonnier non génétiquement modifiées (SG125, DP565, ST580 et HS12), tous les régimes contiennent 32 % de protéines, des teneurs en énergie brute semblables ainsi que des vitamines et des minéraux ajoutés dans les conditions standard d'élevage ;

Considérant que la composition chimique a été évaluée dans toutes les rations de nourriture et que les résultats confirment l'équivalence de composition entre le cotonnier MON88913 et son témoin (cf 7.1-3);

Considérant que les observations ont porté sur les paramètres suivants : comportement et mortalité des poissons, gain de poids des poissons, taux de conversion de la nourriture, composition des filets des poissons à la fin de l'expérience ;

Considérant que les résultats, après analyse statistique, montrent que :

- aucune différence due aux traitements entre les animaux nourris avec le cotonnier MON88913 et le cotonnier témoin ou avec les variétés commerciales testées n'est observée pour ce qui concerne le comportement des poissons, les performances pondérales (mesurées à 4 et 8 semaines), l'efficacité alimentaire et le taux de survie des poissons (de 100 %, sauf pour le lot SG125) ;
- aucune différence n'est observée, à l'issue de l'expérience, en ce qui concerne les données relatives aux caractéristiques de la composition des filets de poissons (protéines, graisses, humidité, cendres) ;

Considérant que, sur la base de l'analyse de ces résultats, on peut conclure à une équivalence alimentaire de la croissance pondérale poisson-chat du cotonnier MON88913 avec son témoin non génétiquement modifié,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que :

- la construction génétique du cotonnier MON88913 est bien caractérisée,
- l'analyse de composition ne met pas en évidence de différence significative compromettant l'équivalence en substance du cotonnier MON88913 par rapport au cotonnier témoin et aux variétés de cotonniers conventionnelles,
- l'étude de toxicité subchronique réalisée chez le rat pendant 90 jours ne met pas en évidence d'effets délétères liés à la consommation du cotonnier MON88913,
- l'étude d'alimentarité réalisée chez le poisson-chat ne met pas en évidence de différences nutritionnelles entre le tourteau de cotonnier MON88913 et le tourteau de cotonnier témoin ou conventionnelles,

En conséquence, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les cotonniers portant l'événement de transformation MON88913 et ses produits dérivés destinés à l'alimentation humaine et animale présentent le même niveau de sécurité sanitaire que des produits dérivés des variétés de cotonnier conventionnelles.

Mots clés. : OGM, cotonnier MON88913, glyphosate

La Directrice Générale

Pascale BRIAND