

Maisons-Alfort, le 3 septembre 2008

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande de renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché du cotonnier génétiquement modifié MON 531, résistant aux lépidoptères, pour l'utilisation de certains dérivés en 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 18 juin 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 de l'autorisation de mise sur le marché du cotonnier génétiquement modifié MON 531, résistant aux lépidoptères, pour l'utilisation de certains dérivés en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (EFSA-GMO-RX-MON531).

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, 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 10 juillet 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 de produits dérivés des cotonniers portant l'événement de transformation MON531, à savoir :

- ✓ l'huile 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 ;
- ✓ 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 MON 531 avaient été examinés en 1998 par le Comité Scientifique des Plantes (SCP). Les hybrides issus du croisement conventionnel des cotonniers MON531 et MON1445 et les cotonniers génétiquement modifiés MON15985 (incluant l'événement MON531) 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 deux avis étaient réservés en l'absence d'information en particulier sur la caractérisation moléculaire de l'événement de transformation MON531.

Les cotonniers MON 531 contiennent une copie fonctionnelle du gène *cry1Ac* qui confère la résistance à certains lépidoptères et, plus spécifiquement, au ver (*Helicoverpa armigera*) et au ver rose (*Pectinophora gossypiella*) de la graine des cotonniers.

#### (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 un plasmide binaire. Il comporte l'origine de réplication de pBR322, le gène *rop* participant au contrôle de la réplication, l'origine de réplication (*ori-V*) permettant la

réplication chez *Agrobacterium*, le gène procaryote *aad* et la bordure droite du T-DNA. Il comporte également deux cassettes d'expression dans les plantes:

- ✓ la cassette *cry1Ac* constituée du gène *cry1Ac*, du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur CaMV et de la séquence de terminaison correspondant à la partie 3' du gène de la protéine de stockage 7S de soja.
- ✓ 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 MON531 sont la protéine CRY1Ac qui confère la résistance à certains lépidoptères et la néomycine phosphotransférase de type II (NPTII), inactivant en les phosphorylant les antibiotiques de la famille des aminoglycosides. 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 CRY1Ac exprimée dans les cotonniers MON531 est codée par un gène chimérique résultant de la fusion de 2 fragments de gènes provenant de *Bacillus thuringiensis* :

- ✓ les acides aminés 1 à 466 sont codés par un fragment du gène *cry1Ab*, les 2 protéines CRY1Ac et CRY1Ab ne diffèrent que par 6 acides aminés dans cette région,
- ✓ les acides aminés 467 à 1178 sont codés par un fragment du gène *cry1Ac*, une leucine en position 166 est substituée par une sérine et constitue la seule différence avec la séquence de la protéine native.

Les premières analyses de type Southern, réalisées en 1994, avaient conclu à l'intégration de deux inserts non liés. Ces analyses ont été reconduites en 2001, associées à d'autres méthodes plus récentes (PCR, séquençage et marche sur le chromosome), elles ont permis de définir précisément que deux insertions étaient présentes dans le génome nucléaire des cotonniers portant l'événement MON531 :

- 1) l'insert dit **fonctionnel** comporte depuis la bordure droite attendue, l'intégrité des cassettes d'expression des gènes chimériques *cry1Ac* et *nptII* encadrant le gène bactérien *aad*, et l'origine de réplication OriV fonctionnelle chez la plupart des bactéries à gram négatif et depuis la même bordure, mais dans l'orientation inverse, la fin du gène chimérique *Cry1Ac* suivi du terminateur 7S.
- 2) l'insert dit **muet**, indépendant génétiquement, est constitué de 242 pb à partir de la frontière droite, ne comportant donc qu'une moitié environ du terminateur de transcription 7S.

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 spectromycine 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>.

L'analyse des régions bordant les insertions a été réalisée. Concernant l'insertion fonctionnelle, la comparaison des séquences des bordures avec la séquence du cotonnier initialement transformé Coker 312 révèle que l'insertion a eu lieu dans le génome nucléaire et s'est accompagnée d'une délétion de 85 pb. La recherche de nouveaux cadres de

<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 (EFSA 2004).

lecture ouverte a été effectuée dans ces régions dont 306pb et 210pb d'ADN génomique sont connus en 5' et en 3', respectivement.

La même analyse a été réalisée sur les régions bordant l'insert muet de 242 pb (380 pb et 500 pb de séquences génomiques connues en 5' et en 3'). Aucun de ces nouveaux cadres de lecture ouverte putatifs traduits ne présente d'homologie de séquences avec les protéines toxiques et/ou allergènes répertoriées dans les bases de données.

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

Les cotonniers MON531 ont été génétiquement modifiés pour exprimer les protéines CRY1Ac 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 CRY1Ac, 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 MON531 et témoins cultivés sur six sites aux États-Unis en 1992.

Comme attendu de par la spécificité des promoteurs, le tissu qui exprime le plus fortement les deux protéines sont les feuilles avec en moyenne respectivement 1,5 µg de CRY1Ac et 3 µg de NPTII par g de poids frais. On relève des valeurs moyennes sensiblement plus faibles dans les graines à maturité où elles sont respectivement de 0.8 µg de CRY1Ac et de 2.4 µg de NPTII par g de poids frais.

L'expression est très faible dans le nectar et le pollen (environ 100 fois inférieure) et la protéine AAD n'est détectée dans aucun tissu.

Ces données d'expression sont complétées par des données plus récentes réalisées sur des échantillons de plantes cultivées en 1998 et 1999.

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

Le caractère apporté par l'insertion fonctionnelle s'exprime de façon constante au cours des générations et se comporte comme un locus mendélien dominant.

Plusieurs études ont démontré la stabilité de l'insert :

- ✓ la stabilité d'expression des protéines CRY1Ac et NPTII au cours des générations ;
- ✓ des données de ségrégation de descendants issus de 4 générations de backcross ;
- ✓ des données de ségrégation des plantes R1 et de leurs descendants après auto-pollinisation ;
- ✓ des profils de type Southern comparables dans des lignées R5 et R6 et dans des lignées commerciales portant l'événement MON531.

La présence de l'insert fonctionnel a été démontrée après 12 générations de backcross et le caractère de résistance aux insectes est stable depuis les premiers essais en champs en 1990.

L'insert muet de 242 pb localisé indépendamment sur le génome nucléaire du cotonnier n'est pas retrouvé dans deux variétés commerciales analysées. Inutile à l'expression du caractère, il n'est pas retenu dans le choix des descendants au cours des processus de sélection par croisement conventionnel.

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

- (7.1.3)** Les analyses de la composition chimique ont été publiées (Berberich *et al.*, 1996), elles ont porté sur les graines de coton et sur les produits dérivés (huile raffinée et tourteau toasté). Les échantillons proviennent de cotonniers MON531 et de cotonniers témoins Coker 312 cultivés dans 6 états des États-Unis (6 répétitions par site) en 1992 et 1993. L'analyse statistique a consisté à comparer les valeurs moyennes de composition des graines et des produits dérivés de cotonniers MON531 avec celles des graines de cotonnier Coker 312.

Les composés suivant de la graine ont été analysés : 6 paramètres proximaux (teneur en protéine, lipide, hydrate de carbone, cendre, eau et calorie), 11 acides gras, 4 facteurs anti-nutritionnels (gossypol, acide dihydrosterculique, sterculique et malvalique), 18 acides aminés. Le gossypol et les paramètres proximaux ont été mesurés sur les échantillons de plantes cultivés en 1992 et 1993. Les valeurs ont été comparées à la gamme des valeurs de référence pour ces produits issues des données de la littérature. Les teneurs en 4

aflatoxines sont inférieures à la limite de détection dans les graines des cotonniers génétiquement modifiés et témoins dans la plupart des sites, des valeurs positives ont été obtenues dans les cotonniers témoins sur certains sites.

Les résultats de l'analyse statistique ne montrent aucune différence de concentration sur la plupart des composés mesurés comprenant les facteurs anti-nutritionnels comme le gossypol. Quelques différences significatives sont observées pour les teneurs en acides aminés. Toutefois, ces différences sont faibles et entrent dans la gamme des valeurs de référence sauf pour la méthionine qui excède légèrement la borne supérieure.

L'analyse de composition chimique a concerné la teneur en gossypol mesurée dans les tourteaux bruts et toastés, la teneur en acides gras (12), en gossypol et en alphatocophérol dans l'huile raffinée. L'analyse statistique des données ne fait apparaître aucune différence de composition entre les tourteaux et l'huile issus des cotonniers MON531 et ceux issus des cotonniers Coker 312. La teneur en protéine recombinante a été mesurée dans ces produits et montre que les deux protéines CRY1Ac et NPTII ne sont pas détectables dans l'huile et dans les fibres des plantes issues de leur transformation.

#### **(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 MON531 ont pour vocation à être utilisés comme les cotonniers conventionnels sous tous les modes de consommation chez l'homme et l'animal.

Les protéines CRY1Ac et NPTII ne sont pas détectées dans l'huile alimentaire et dans les fibres issues de cotonniers MON531.

#### **(7.8) Toxicologie**

##### **(7.8.1) Evaluation de la sécurité des organismes donneurs**

*Bacillus thuringiensis*, qui est naturellement présent dans les sols, produits des protéines insecticides. L'application des spores bactériens aux cultures est le traitement insecticide de choix en agriculture biologique, ils sont utilisés depuis 1958 aux USA.

##### **Evaluation de la sécurité la protéine CRY1Ac**

La protéine CRY1Ac exprimée chez les cotonniers MON531 n'a pas d'effet insecticide en l'état. Elle est ingérée par l'insecte puis digérée par les protéases de l'intestin des larves de l'insecte libérant le domaine actif d'environ 600 acides aminés et conduisant à la formation de pores qui déstabilisent les membranes des cellules de l'épithélium intestinal de l'insecte.

Les protéines Cry ont fait l'objet d'un programme toxicologique complet à partir de cristaux de protéine Bt extraites de *Bacillus thuringiensis* (toxicité par administration unique ou répétée 6 mois, reprotoxicité, cancérogénicité 2 ans chez le rongeur) qui atteste de l'absence de toxicité chez les organismes non cibles (pour revue Betz *et al.*, 2000). En l'absence de récepteurs chez les mammifères, les oiseaux et les poissons, ces protéines sont dépourvues de toxicité chez ces espèces (Sacchi *et al.*, 1986).

L'absence de liaison avec des récepteurs du tractus digestif a notamment fait l'objet d'études avec Cry1Ab chez le rongeur, mais aussi chez le singe et chez l'Homme (Hofmann *et al.*, 1988).

Outre ces informations, des résultats d'expériences permettent de compléter l'évaluation de la sécurité de la protéine CRY1Ac. Ces expériences sont :

- ✓ des analyses de la séquence de la protéine CRY1Ac montrant qu'elle ne présente pas d'homologie de séquences avec des protéines toxiques connues excepté les  $\delta$ -endotoxines ;

- ✓ la protéine CRY1Ac a été soumise à l'action de la pepsine à pH 1,2 (milieu gastrique simulé, SGF) et soumise à l'action de la pancréatine à pH 7,5 (milieu intestinal simulé) conduit à la dégradation rapide de la protéine (aucun fragment présentant une

réactivité immunologique n'est identifié après 30 secondes de contact en milieu gastrique et après 30 minutes de contact en milieu intestinal) ;

✓ une étude de toxicité aiguë de la protéine CRY1Ac produite par *E. coli* (pureté 68%), administrée par voie orale chez la souris aux trois doses de 500, 1000 et 4200 mg/kg de poids corporel, ne conduit pas à l'observation d'effet néfaste après 7-8 jours d'observation (clinique, poids corporel, consommation, observations macroscopiques sur 40 organes).

#### **Evaluation de la sécurité la protéine NPTII**

Le gène *nptII* et son produit d'expression sont largement répandus dans la nature notamment chez les bactéries ou dans l'intestin humain. La sécurité de la protéine NPTII a fait l'objet de plusieurs publications internationales à comité de lecture qui démontrent son absence de toxicité envers l'homme et l'animal (Flavell *et al.*, 1992 ; Nap *et al.*, 1992, Fuchs *et al.*, 1993 a et b). L'AESA avait par ailleurs jugé que l'utilisation du gène *nptII* comme gène de sélection dans les plantes génétiquement modifiées ne constituait pas un risque pour l'environnement et pour la santé humaine (EFSA, 2004).

Des expériences complémentaires montrent de plus que :

- ✓ la protéine purifiée obtenue à partir de *E. coli* administrée *per os* à des souris à la dose de 5000 mg/kg de poids corporel ne met pas en évidence de signe toxique après 8 jours d'observation.
- ✓ en milieu gastrique simulé (pepsine, pH1,0) ou intestinal simulé (pancréatine pH 7,5), la protéine NPTII est dégradée, les demi-vies respectives étant de moins de 10 secondes et de 2 à 5 minutes.

L'équivalence entre les protéines produites par *E. coli* utilisées pour les essais de toxicité chez les rongeurs avec les protéines exprimées dans la plante a été démontrée.

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

Deux références bibliographiques font état de résultats d'une étude de toxicité sub-chronique par administration réitérée de 4 semaines chez le rat à raison de 5 et 10% de taux d'incorporation de graines de cotonnier cru dans une ration équilibrée. Cependant ces données confuses ne permettent pas de juger si elles se rapportent à la même étude et ne font l'objet d'aucun commentaire dans le dossier technique. Elles n'ont, par conséquent, pas été prises en compte dans la présente évaluation.

#### **(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'allergène ;
- ✓ la recherche d'identité de séquence des acides aminés de la protéine PAT et NPTII (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 ;
- ✓ l'absence de glycosylation des protéines CRY1Ac et NPTII ;
- ✓ la digestion rapide *in vitro* de ces protéines en milieu gastrique ou intestinal simulé ;
- ✓ la très faible teneur en protéine par rapport au poids frais des graines de cotonnier (0,8 µg de CRY 1Ac/g et 0,8 µg de protéine NPTII /g).

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**

L'étude d'alimentarité réalisée chez les vaches laitières a fait l'objet d'une publication (Castillo *et al.*, 2004). L'expérience avait pour objectif d'évaluer l'effet d'un régime à base de graines de cottonniers génétiquement modifiés MON531 sur l'efficacité alimentaire, le niveau de production et la composition du lait de vaches laitières. Les animaux (12 vaches) nourris à base de variétés de cottonniers transgéniques dont le MON531 ont été comparés à ceux nourris à base de variétés de cottonniers commerciales ou témoin non génétiquement modifiés. Les graines de cotonnier sont incorporées au taux de 10% dans la ration (correspondant à 2,5 kg par animal et par jour).

La composition chimique des graines de cotonniers incorporées a été analysée et les résultats montrent une équivalence entre les graines de cotonnier MON531 et les graines de cotonniers témoins ou commercialisés. Cette analyse complète l'analyse d'équivalence en substance présentée § 7.1.3.

L'analyse statistique des résultats ne met pas en évidence de différences significatives pour les paramètres considérés entre les vaches nourries à base de variétés de cotonniers MON531 et celles nourries à base de variétés commerciales de cotonniers.

#### **Conclusion de l'Agence Française de sécurité sanitaire des aliments**

La caractérisation moléculaire réactualisée démontre la présence de deux inserts dont un seul est fonctionnel et permet l'expression de la protéine insecticide CRY1Ac et de la protéine NPTII.

Les cotonniers portant l'événement de transformation MON531 comportent dans leur génome des gènes et des séquences bactériens inutiles à l'expression du caractère agronomique recherché.

Parmi eux, 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 (EFSA 2004 et EFSA guidance 2006).

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 MON531, résistance aux lépidoptères

**La Directrice Générale**

**Pascale BRIAND**

## BIBLIOGRAPHIE

- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL. **2000** Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32, 156-173.
- Berberich S, Ream JE, Jackson TL, Wood R, Stipanovic R, Harvey P, Patzer S and Fuchs RL. **1996** The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 365-371.
- Castillo AR, Gallardo MR, Maciel M, Giordano JM, Conti, Gaggiotti MC, Quaino O, Gianni C and Hartnell GF **2004**, Effects of feeding rations with genetically modified whole cottonseed to lactating Holstein cows, 87, 1778-1785.
- 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.
- Flavell, R. B., Dart, E., Fuchs, R. L. and Fraley, R. T. **1992** Selectable marker genes: safe for plants?, *Bio/Technology*, 10, 141-144.
- Fuchs, R. L., Heeren, R. A., Gustafson, M. E., Rogan, G. J., D.E., B., Leimgruber, R. M., Finn, R. F., Hershman, A. and Berberich, S. A. **1993a** Purification and characterisation of microbially neomycinphosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein, *Bio/Technology*, 11, 1537-1542.
- Fuchs, R. L., Ream, J. E., Hammond, B. G., Naylor, M. W., Leimgruber, R.M. and Berberich, S. A. **1993b** Safety assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) protein, *Bio/Technology*, 11, 1543-1547.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Rie, J. V., Jansens, S. and Mellaert, H. V. **1988** Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target PNAS, 85, 7844-7848.
- Nap, J. P., Bijvoet, J. and Stiekema, W. J. **1992** Biosafety of kanamycin resistant transgenic plants: and overview, *Transgenic Research*, 1, 239-249.
- Sacchi FV, Parent P., Hanozet G., Giordana B., Luthy P et Wolfersberger MG **1986** *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K<sup>+</sup>-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells, *FEBS letters*, 204, 213-218.