

Maisons-Alfort, le 22 juin 2004

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif 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, à des fins de culture et de transformation pour des utilisations non  
alimentaires et pour l'alimentation animale, au titre de la directive 2001/18/CE**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 12 mai 2004 par la Direction générale de l'alimentation 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, à des fins de culture et de transformation pour des utilisations non alimentaires et pour l'alimentation animale, au titre de la directive 2001/18/CE (dossier n°C/SE/96/3501 déposé auprès des autorités suédoises).

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  $\alpha$  1-4) et d'amylopectine (polymère branché à la fois en  $\alpha$  1-4 et en  $\alpha$  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 et l'industrie agroalimentaire.

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.

Afin de valoriser la pulpe<sup>1</sup> la plus riche en matière sèche, ce co-produit est utilisé en alimentation animale, exclusivement destiné aux animaux ruminants (bovins).

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 juin 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

### Informations relatives à la modification génétique et à la plante génétiquement modifiée

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*<sup>2</sup>, sous le contrôle du promoteur *nos*, comme marqueur de sélection et exprimant une résistance à la kanamycine ;

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 ;

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

<sup>2</sup> 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](http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/384_en.html)

- 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 PCR<sup>3</sup>) ;
- la stabilité de l'insertion a été vérifiée sur plusieurs générations de clones ;

Considérant qu'au cours du transfert et/ou de l'insertion, il y a eu perte de fragments (bordure gauche) et des modifications portant sur le fragment contenant le gène *gbss* en orientation antisens (perte de 254 paires de bases (pb) par rapport au fragment du gène *gbss* présent dans le plasmide) et qu'il est observé 8 transitions ou transversions (dont 4 dans la séquence du gène *gbss*) sans qu'il soit indiqué si ces modifications ponctuelles entraînent (ou non) des changements d'acides aminés par rapport à la séquence initiale pour les séquences traduites ;

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

Considérant que les séquences bordures de l'insertion ne figurent pas dans le dossier et, par conséquent, qu'aucune bio-analyse de ces séquences bordures n'est présentée ;

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 fragment<sup>4</sup> 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 a une correspondance avec une séquence de 130 acides aminés homologues de la séquence d'une protéine de résistance à la bléomycine et 68 acides aminés homologues de l'ornithine cyclodéaminase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- l'ORF 1 et l'ORF 4 sont cependant transcrites comme un seul ARN, ce qui rend improbable le fait que l'ORF4 soit exprimée comme une seule protéine dans la plante ;
- l'ORF 4 n'est exprimée que sous l'action d'un promoteur bactérien, comme cela a pu être montré par ailleurs ;
- 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) ;

#### **Informations relatives à la composition chimique de la pomme de terre génétiquement modifiée**

Considérant que la pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1 a fait l'objet de nombreux essais en champ en Suède entre 1993 et 2001 totalisant 123 essais ;

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, 1997 et 1998, 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 ;
- une teneur significativement supérieure en fructose, saccharose, vitamine C, nitrates et acide chlorogénique dans la pomme de terre EH92-527-1 ;
- 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 ;

<sup>3</sup> PCR : Polymerase Chain Reaction

<sup>4</sup> 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.

**Informations relatives à l'expression des produits de gène dans les co-produits de transformation de la pomme de terre**

Considérant que 3 co-produits sont issus de la transformation de la pomme de terre : la pulpe, la plus riche en matière sèche, la phase liquide et les eaux de rinçage de l'amidon et que seule la pulpe est utilisée pour l'alimentation animale et est exclusivement destinée aux ruminants (bovins) (les deux autres co-produits sont généralement épandus sur le sol comme fertilisants) ;

Considérant que ces co-produits présentent les caractéristiques suivantes :

Co-produit	Pulpe				Phase liquide		Eau de rinçage	
	g/kg poids frais		g/ kg matière sèche		g/litre		g/litre	
Pomme de terre	EH92-527-1	Témoin	EH92-527-1	Témoin	EH92-527-1	Témoin	EH92-527-1	Témoin
Protéine	13	14	46	39	-	-	-	-
Matière sèche	-	-	-	-	52	52	1,1	1,1
pH	-	-	-	-	6,3	6,2	7,3	7,3
Fragment (213 pb) du gène <i>nptII</i>	++	+	++	+	0	0	0	0

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* ;

Considérant, par contre, qu'un fragment de 213 pb du gène marqueur *nptII* a été retrouvé aussi bien dans la pulpe de la pomme de terre EH92-527-1 que dans le témoin non génétiquement modifié (probablement contaminé par des bactéries de l'environnement spontanément résistantes à la kanamycine) mais que toutefois ces fragments sont absents de la phase liquide ou des eaux de rinçage ;

Considérant que la protéine NPTII est présente dans la feuille à raison de 2,3 ng/g de feuille fraîche soit 5 fois plus que dans la feuille de la plante témoin ;

**Information relative à la toxicité, à la dégradation *in vitro* et au potentiel allergénique de la protéine NPTII**

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 mais que, toutefois, la fermentation produite lors de l'ensilage ne fait pas disparaître les nucléotides du produit initial ;

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 ces données (résultats de dégradation *in vitro* de la protéine 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 ;

**Etude de tolérance et de valeur alimentaire chez l'animal cible**

Considérant que le rat, animal monogastrique, ne digère pas l'amidon de pomme de terre cru et refuse de consommer une ration à base de pulpe à un taux d'incorporation significatif pour permettre la réalisation d'essai de toxicité subchronique ;

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 ne sont pas modifiés par le traitement,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les résultats de composition chimique, d'analyse des co-produits et de l'étude d'alimentarité réalisée avec des génisses en croissance permettent de conclure que la consommation de la pulpe de pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1 par les ruminants ne présente pas de risques nutritionnels.

Elle considère cependant que, conformément aux lignes directrices de l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (AESA), **il conviendrait de disposer de la bio-analyse des séquences bordures avec l'insert. Cela permettrait de savoir si l'insertion a eu lieu dans un gène ou un autre type de séquence et de vérifier que d'autres ORF qui partiraient de la séquence génomique vers l'insert et réciproquement ne conduisent pas à des peptides non encore caractérisés.**

**En l'absence des informations indiquées ci-dessus, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments ne peut rendre un avis scientifiquement fondé concernant la sécurité sanitaire d'une consommation de pomme de terre portant l'événement de transformation EH92-527-1 par les ruminants.**

Martin HIRSCH