

Maisons-Alfort, le 16 septembre 2005

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un coton
génétiquement modifié MON 531 x MON 1445, tolérant au glyphosate
et résistant à des insectes, pour l'utilisation 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 21 juillet 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 coton génétiquement modifié MON 531 x MON 1445, tolérant au glyphosate et résistant à des insectes, pour l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2005-09).

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 8 septembre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

La demande, objet du présent avis, porte sur coton hybride MON 531 x MON 1445 issu du croisement conventionnel entre la lignée MON 531 rendue résistante à des insectes par l'introduction du gène *cry1Ac* et la lignée MON 1445 rendue tolérante au glyphosate par introduction du gène *cp4 epsps* (isolé d'une souche d'*Agrobacterium*). Les produits issus de la graine de coton sont destinés à être utilisés en alimentation humaine (huile) et animale (tourteau de coton). La demande exclut l'importation de graines et la culture.

Les deux lignées parentales MON 531 et MON 1445 avaient été examinés en 1998 par le Comité scientifique des plantes (SCP) et l'huile issue de chacun de ces 2 OGM avait reçu une autorisation de commercialisation le 19 décembre 2002 au titre du règlement (CE) n°258/97.

(C) Informations relatives à la modification génétique
Événement MON 531

- (1-3) Considérant que la construction, introduite par *Agrobacterium tumefaciens*, est constituée d'un gène marqueur *nptII* (néomycine phospho-transférase), d'un gène codant la protéine Cry1Ac induisant la résistance à des insectes et d'un fragment du gène *cry1Ac* (portion 3') inactif, les deux inserts étant liés et fonctionnant comme un seul locus. On ne retrouve pas de séquence correspondant au plasmide dans le génome du coton MON 531 à l'exception du gène *aad* qui ne s'exprime pas (vérification par ELISA) et d'un fragment de l'origine de réplication *ori-V*. L'intégrité de la construction introduite, évaluée par cartographie de restriction, a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante sur 6 générations successives ;

Événement MON 1445

Considérant que la construction, introduite par *Agrobacterium tumefaciens*, est constituée d'un gène marqueur *nptII* (néomycine phospho-transférase) et d'un gène codant la protéine CP4 EPSPS. On ne retrouve pas de séquence correspondant au plasmide dans le génome du coton MON 1445 à l'exception du gène *aad* qui ne s'exprime pas (vérification par ELISA) et d'un fragment de l'origine de réplication *ori-V*. Il y a une seule insertion et cette insertion contient une seule copie de la construction. L'intégrité de la construction introduite, évaluée par cartographie de restriction, a été vérifiée ainsi que la stabilité de la construction dans la plante sur 3 générations successives.

Hybride MON 531x MON 1445

Considérant que l'hybride résulte d'un croisement conventionnel des deux lignées de coton, MON 531 et MON 1445.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée**(2) Événement MON 531**

Considérant que l'insert fonctionnel MON 531 comporte deux cassettes, l'une contenant un fragment de l'origine de réplication *ori-V*, un promoteur 35S, le gène *nptII*, un terminateur *nos*, le gène *aad*, un promoteur *e35S*, le gène *cry1Ac* et une séquence de terminaison 7S 3', l'autre contenant un fragment de la séquence du gène *cry1Ac* et une séquence de terminaison 7S 3' orientées en sens inverse par rapport à la 1^{ère} cassette. Entre ces deux cassettes, il y a une séquence de l'hôte d'environ 360 pb ;

Considérant que la construction porte également une insertion additionnelle de 242 pb qui contient une partie de la séquence 7S 3' ;

Considérant la présence de séquences superflues d'origine bactérienne (*ori-V*, *aad*) ;

Considérant qu'il conviendrait cependant de disposer :

- des informations relatives à la caractérisation de la séquence située entre les deux cassettes de l'insert MON 531 et de son analyse informatique ;
- d'une analyse des séquences de jonction 5' et 3' de l'insertion MON 531 avec le génome du coton avec recherche des ORF possibles dans les 6 cadres de lecture et comparaison avec des séquences connues figurant dans les bases de données ;

Événement MON 1445

Considérant que l'insert MON 1445 comporte un fragment de l'origine de réplication *ori-V*, un promoteur 35S, le gène *nptII*, un terminateur *nos*, le gène *aad*, un promoteur *FMV*, la séquence du peptide de transit vers le chloroplaste *ctp2*, le gène *cp4 epsps*, et une séquence de terminaison *E9 3'* ;

Considérant qu'il conviendrait de disposer d'une analyse des séquences de jonction 5' et 3' de l'insertion MON 1445 avec le génome du coton avec recherche des ORF possibles dans les 6 cadres de lecture et comparaison avec des séquences connues figurant dans les bases de données ;

Hybride MON 531x MON 1445

Considérant que le génome de l'hybride MON 531 x MON 1445 contient deux inserts localisés sur des sites séparés sur le génome nucléaire :

Considérant que la présence des gènes des deux parents a été vérifiée par hybridation de type Southern avec une sonde correspondant à *ori-V* mais que cette sonde ne permet d'identifier que la partie droite de l'insertion (à noter une inversion dans la légende pour les couloirs 3 et 4 de la figure 4 du dossier technique : le couloir 3 correspond à l'ADN du MON 531 et non à celui du MON 1445 et inversement) ;

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

Considérant que le dosage quantitatif des protéines exprimées (méthode ELISA) dans les graines et les feuilles récoltées à partir de 3 variétés portant les événements MON 531 et MON 1445 sur quatre sites en 1998 aux Etats-Unis, a été comparé à celui de 3 variétés de plantes témoins "traditionnelles", 3 variétés de MON 1445 et 3 variétés de MON 531 ;

Considérant que les résultats obtenus indiquent que l'hybride "héríte" quantitativement de la teneur en Cry1Ac de son parent MON 531 et de la teneur en CP4 EPSPS de son parent MON 1445 avec une teneur de l'ordre de 10 fois plus élevées dans la graine que dans les feuilles et d'une teneur en NPTII correspondant à la somme des expressions du gène *nptII* apporté par chacun des parents ; on peut néanmoins regretter l'absence de traitement statistique des données qui aurait permis d'étudier la variabilité de l'expression des 3 protéines entre les 3 variétés d'hybride MON 531 x MON 1445, et entre les variétés parentales et témoins versus les variétés hybrides génétiquement modifiées ainsi que d'éventuelles différences liées au site ;

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

Considérant que la stabilité génétique et phénotypique des lignées parentales MON 531 et MON 1445 a été vérifiée par Southern blot au cours de plusieurs générations (voir C.3.1-3) ;

Considérant qu'à partir de l'ADN extrait de coton MON 531 x MON 1445 de la 12^{ème} génération, la présence des gènes apportés par les parents a été détectée, sans toutefois que la présence de l'intégralité des inserts ait été vérifiée (voir D.2) ;

Considérant que les risques d'une recombinaison entre les deux événements de transformation reste hautement improbable ;

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

(7.1-3) Considérant que les analyses de composition de l'hybride MON 531 x MON 1445, comparées à celles des lignées parentales MON 531 et MON 1445, d'une variété non transgénique témoin et de 11 variétés de coton commercialisées, ont porté sur les graines issues de plantes cultivées sur 4 sites (4 répétitions par site) aux Etats-Unis en 1999 ; 49 composants ont été analysés dont : humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, deux facteurs toxiques et anti-nutritionnels (gossypol et acide cyclopropénoïde) et l'aflatoxine,

Considérant que, sur les 11 variétés commercialisées, une seule a été cultivée sur les 4 mêmes sites que les variétés transgéniques et la variété témoin et que les 10 autres ont été cultivées sur un ou deux des sites des variétés transgéniques ;

Considérant que les résultats disponibles font apparaître au total 106 différences statistiquement significatives (à $p < 0,05$) sur 735 comparaisons entre l'hybride et chacune des lignées parentales ou la variété non transgénique témoin, et 91 différences statistiquement significatives (à $p < 0,05$) sur 490 comparaisons entre la variété non transgénique témoin et chacune des lignées parentales ;

Considérant que ces différences sont dans la fourchette des données des 11 variétés commerciales combinées et cultivées sur un, deux ou 4 des mêmes sites que les variétés transgéniques ;

Considérant cependant qu'on observe :

- pour 3 sites sur 4 et pour les sites combinés des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) pour l'acide myristique et stéarique entre l'hybride et la lignée parentale MON 531,

- pour les 4 sites et pour les sites combinés des différences statistiquement significatives ($p < 0,001$) pour l'acide palmitique (acP) entre l'hybride et la lignée parentale MON 531 (quantité d'acP plus faible dans l'hybride que dans MON 531),
- des différences statistiquement significatives ($p < 0,001$ ou à $0,006$) entre la lignée parentale MON 531 et la variété témoin (quantité d'acP plus élevée dans l'hybride que dans le témoin) pour les 4 sites alors qu'aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence dans la comparaison entre la lignée parentale MON 1445 et la variété témoin et une seule différence entre l'hybride et la lignée parentale 1445 ;

Considérant que ces différences sont inversées dans le cas de l'acide linoléique pour ces mêmes comparaisons ;

Considérant que cette légère perturbation métabolique qui pourrait être liée à la présence conjointe des deux gènes *cry1Ac* et *cp4 epsps* devrait être clarifiée pour s'assurer de l'équivalence en substance de l'hybride avec la variété témoin ;

(7.4) **Caractéristiques agronomiques**

Considérant qu'une comparaison des caractéristiques agronomiques et phénotypiques de 3 variétés de coton témoin, de coton portant l'évènement MON 531 ou MON 1445 et de coton hybride MON 531 x MON 1445, effectués sur 4 sites aux USA avec 4 répétitions par site (une seule année de culture), n'a mis en évidence aucune différence sur 7 paramètres ;

(7.8) **Toxicologie**

(7.8.1) Considérant que les protéines NPTII, CP4 EPSPS et Cry1Ac ont déjà fait l'objet :

- d'une étude de toxicologie aiguë chez la souris et qu'aucun effet toxique aigu n'a été observé,
 - de tests de digestion protéolytique *in vitro* et que ces protéines sont rapidement dégradées,
- et qu'elles ne présentent pas d'homologie avec des séquences connues de peptides toxiques ;

(7.8.4) **Etude de toxicité chez l'animal de laboratoire**

Considérant qu'aucune autre donnée de toxicologie sur l'animal n'est disponible, les lignées parentales MON 531 et MON 1445 n'ayant pas fait l'objet d'une étude de toxicité subchronique de 90 jours chez le rat ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que les séquences d'acides aminés des protéines NPTII, CP4 EPSPS et Cry1Ac ne montrent pas de similitude structurale avec celle d'allergènes connus répertoriés dans les bases de données ;

Considérant qu'il convient de noter que les données disponibles (résultats de dégradation *in vitro* 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'un essai d'alimentarité a été réalisé sur un total de 700 poissons chats nourris avec du tourteau de coton (20 % de la ration alimentaire) pendant 8 semaines afin de comparer les effets d'une consommation de tourteau issu d'un coton hybride MON 531 x MON 1445 (et d'un coton hybride MON 15985 x MON 1445) avec les effets d'une consommation d'une variété témoin non transgénique et de 4 variétés de coton commerciales conventionnelles (7 traitements, avec 5 répétitions et 20 animaux) ;

Considérant que l'analyse des différents régimes (matière sèche, protéines brutes, matière grasse, cendres) ne met pas en évidence de différence entre ces régimes ;

Considérant que 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 ;

Considérant qu'aucun effet sur la survie des animaux n'a été observé (pas de mortalité quels que soient les lots) et que la croissance et l'efficacité alimentaire des poissons nourris avec l'hybride MON 531 x MON 1445 ne diffèrent pas significativement de celles mesurées chez les animaux nourris avec les 4 variétés commerciales conventionnelles et qu'elles sont légèrement supérieures ($p < 0.05$) à la variété témoin non transgénique ;

Considérant que la composition en lipides et minéraux totaux des filets de poissons est similaire entre les lots et, bien qu'on note une teneur plus faible (- 2,8 % et -1,7 %) en protéines brutes des filets chez les animaux recevant le coton hybride MON 531 x MON 1445 comparée respectivement aux filets des poissons nourris avec la variété témoin et les 4 variétés de coton conventionnelles, le tourteau de coton issu de la variété hybride MON 531 x MON 1445 apparaît nutritionnellement équivalent, pour le poisson chat, aux 4 variétés commerciales testées et à la variété témoin ;

Considérant cependant qu'on peut s'interroger sur la pertinence du choix du poisson chat pour évaluer l'impact de la consommation de tourteau de coton MON 531 x MON 1445 sur la santé des ruminants ou des monogastriques,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que pour s'assurer de la sécurité sanitaire des produits issus d'un coton MON 531 x MON 1445, il conviendrait de compléter le dossier initial avec les informations suivantes :

- disposer des informations relatives à la caractérisation du fragment de 360 pb environ situé entre les deux cassettes de l'insert MON 531 et de son analyse informatique (D.2.a),
- disposer d'une analyse des séquences de jonction 5' et 3' de l'insertion MON 531 et MON 1445 avec le génome du coton avec recherche des ORF possibles dans les 6 cadres de lecture et comparaison avec des séquences connues figurant dans les bases de données ainsi que pour le fragment additionnel de 242 pb dans le cas du MON 531 (D.2.a);
- compléter la vérification de la présence des gènes des deux parents en utilisant une sonde qui permette d'identifier également la bordure gauche des inserts (D.2.a) ;
- disposer d'une analyse statistique des données de composition chimique adaptée au plan expérimental de telle sorte que l'on puisse juger des effets des sites de culture et des interactions potentielles avec l'effet des variétés. Une telle analyse devrait permettre de clarifier l'impact des variations de teneurs observées, notamment en acides palmitique, linoléique et myristique, dans les graines du coton hybride génétiquement modifié (D.7.1-3) ;
- compte tenu de l'absence de données toxicologiques en relation avec la modification génétique présente dans les lignées parentales, réaliser une étude de toxicité subchronique 90 jours chez le rat avec le coton MON 531 x MON 1445 afin de s'assurer que les modifications génétiques introduites ne sont pas susceptibles d'induire d'effets néfastes pouvant présenter un risque pour la santé humaine ou animale (D.7.8.4) ;
- compléter l'étude d'alimentarité chez le poisson chat par une étude sur un animal monogastrique ou ruminant (D.7.10.2).