

Maisons-Alfort, le 8 septembre 2005

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à un dossier d'autorisation de mise sur le marché de betteraves à sucre Roundup Ready H7-1, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

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 de betteraves à sucre Roundup Ready H7-1, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-UK-2004-08).

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

Il s'agit de la mise sur le marché de betteraves à sucre (et produits dérivés) portant l'événement de transformation H7-1 qui consiste en l'intégration dans le génome nucléaire d'un gène codant une EPSP synthase tolérante au glyphosate, donc capables de survivre à des traitements à base de cet herbicide.

Les EPSPS présentes dans les plantes et les bactéries sont en général inhibées par le glyphosate, cette inhibition entraînant l'arrêt de la synthèse des acides aminés aromatiques et, par là, la mort de la plante ou de la bactérie. Dans la betterave H7-1, la présence dans les chloroplastes d'une EPSPS supplémentaire insensible au glyphosate (trouvée dans un isolat d'*Agrobacterium*) permet le maintien de la synthèse d'acides aminés et donc la survie de la plante même soumise à un traitement par l'herbicide. L'objectif est ainsi de simplifier et d'améliorer l'efficacité du désherbage des cultures de betteraves sucrières.

La betterave et ses produits dérivés sont destinés à l'alimentation humaine et animale

(C.) Informations relatives à la modification génétique

Considérant que la construction a été introduite par mise en contact d'explants de betterave avec une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* portant un vecteur de transformation ;

Considérant que la construction (ADN-T) portée par le vecteur de transformation est constitué comme suit :

- 25 pb de la bordure droite de l'ADN-T du pTiT37à nopaline ;

- 672 pb correspondant au promoteur à expression constitutive de l'ARN 35S d'un caulimovirus (le Figwort Mosaic Virus) ;
- 310 pb comportant la séquence codant le peptide *ctp2* d'adressage au chloroplaste de l'EPSPS d'*Arabidopsis* ;
- un fragment synthétique de 1363 pb codant (en phase avec le fragment ci-dessus) une séquence identique à celle de l'EPSPS tolérante au glyphosate de la souche CP4 d'*Agrobacterium* ;
- 630 pb issues du signal de terminaison de transcription du gène *rbcS E9* codant la petite sous-unité de la Rubisco de pois ;
- 25 pb de la bordure gauche de l'ADN-Tdu pTi15955, dérivant du pTiA6 à octopine ;

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

- (2) Considérant que des hybridations de type Southern, avec des sondes correspondant aux différentes parties du plasmide vecteur, sur de l'ADN de betterave témoin, du transformant H7-1 et du plasmide vecteur, hydrolysé par plusieurs endonucléases de restriction, permettent de façon convaincante de montrer que par rapport à l'ADN-T du plasmide, la région effectivement transférée est une copie unique et intacte du gène *ctp2::cp4 epsps*, à l'exclusion de toute autre séquence du plasmide vecteur¹ ;

Considérant que le séquençage de la construction insérée dans la plante et des bordures 5' et 3' avec le génome de la plante a été réalisé et qu'il montre que 4 nucléotides sur les 4354 nucléotides insérés diffèrent de ceux présents sur le plasmide vecteur :

- une des mutations se situe dans la séquence codante de l'EPSPS de CP4 mais elle est silencieuse car concerne la transition du 3^{ème} nucléotide d'un codon le transformant en codon synonyme,
- les 3 autres sont localisées dans les séquences régulatrices sans les affecter ;

Considérant que l'analyse bio-informatique des séquences à la jonction entre l'insertion et le génome de la plante a mis en évidence 6 ORF (open reading frame) côté 5' et 3 ORF côté 3' (recherche dans les six cadres de lecture possibles), que la comparaison des 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 ;

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

Considérant que le dosage quantitatif de la protéine CP4 EPSPS (méthode ELISA) dans les feuilles et les parties souterraines de betteraves H7-1 cultivées en 1998 (10 sites) et 1999 (6 sites) situés en Europe montre que la protéine s'exprime dans les feuilles (0,102-0,307 µg/mg de tissu frais) et dans les racines (0,033-0,233 µg/mg de tissu frais), quelles que soient les conditions climatiques et que les plantes aient été traitées au glyphosate ou non (témoin non transgéniques <LD = 1,2-6,0 µg/mg de tissu frais) ;

(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 la lignée H7-1 avec celui extrait de plantes des 2^{ème} et 3^{ème} générations, obtenues par croisement conventionnel ou par autopolinisation, les résultats montrant que la séquence introduite est stable et transmise intégralement dans les descendants ;

¹ Il convient cependant de noter une interprétation erronée de la figure 11 du dossier technique : le fragment Xba1 de 4000 pb, décrit sur le schéma de la figure 5 et identifié dans les Southern blots des figure 6-9, contient tout le gène *ctp2::cp4 epsps* (sauf le promoteur) fusionné à l'ADN nucléaire de betterave et non "a DNA fragment, which contains the promoter fused to a portion of sugar beet genomic DNA".

Considérant que le phénotype de résistance au glyphosate 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 les analyses de composition de feuilles (plus collet) et de racines de betterave H7-1 ont été réalisées en comparaison à celles de betterave isogénique non génétiquement modifiée (utilisée comme témoin), récoltés sur 11 sites en 1998 et 5 sites 1999 situés en Europe (Belgique, France et UK) et à celles de 12 variétés commerciales (référence) ; 55 composants ont été analysés dont :

- teneurs en cendres, fibres, protéines et matière grasse mesurées sur les râpures de racines et sur les feuilles (plus collet) ainsi qu'une détermination par calcul de la teneur en hydrate de carbone (également sur racines et sur feuilles),
- teneur en sucre total, en potassium, en sodium, en sucre invertis et en azote alpha aminé, effectuées sur les râpures de racines,
- composition en acides aminés de la fraction protéique des racines et des feuilles (plus collet)
- teneur en saponines (acide oléanolique),

ainsi que la teneur pour 4 métabolites secondaires (les acides férulique, p-coumarique, oxalique et malonique) obtenues à partir de cinq essais au champ effectués aux USA en 2003 ;

Considérant que, sur l'ensemble des comparaisons effectuées, les résultats de 1999 font apparaître 7 différences statistiquement significatives : 5 dans les feuilles et collets (matière sèche, alanine, glycine, phénylalanine, tyrosine) et 2 dans les racines (acide glutamique et alanine) et ceux des essais de 1998 font apparaître 10 différences statistiquement significatives ($p < 0.05$) entre la betterave H7-1 et le témoin impliquant 4 acides aminés mesurés dans les feuilles et collet (alanine, histidine, phénylalanine et tyrosine) et les six caractères suivants dans les racines :

Analysis	Unit	Mean control	Mean H7-1
Invert sugar	g/100g FW	1.53	0.92*
α amino-N	g/100g FW	0.57	0.50*
Glutamic acid	% total aa	18.26	16.51*
Leucine	% total aa	6.58	6.79*
Tyrosine	% total aa	4.19	4.40*
Valine	% total aa	5.96	6.23*

* : $p < 0,05$

Considérant que dans les essais réalisés en 2003 aux Etats-Unis, la teneur en acide oxalique s'est révélée différente dans 2 échantillons sur 12, alors que les teneurs en acide p-coumarique et malonique étaient inférieures à la limite de quantification et que la teneur en acide férulique n'était par différente de celle du témoin ;

Considérant cependant que l'ensemble des résultats apportés par les essais de 1998 et 1999 étant dans les fourchettes des données obtenues avec les variétés commerciales de référence incluses dans les essais multilocaux, il est possible de considérer la betterave H7-1 comme présentant une composition équivalente à la betterave non génétiquement modifiée ;

(7.4) **Caractéristiques agronomiques**

Considérant qu'une comparaison des caractéristiques agronomiques et phénotypiques de la lignée H7-1 avec celles de betterave isogénique en serre et en champ, sur de nombreux sites en Europe entre 1996 et 2002 a été réalisée ;

(7.6) Effets du procédé

Considérant que le sucre, produit après plusieurs étapes (extraction, lavages, carbonations, évaporation, cristallisation séchage), contient moins de 1% de matière azotée, que le niveau le plus élevé d'une protéine détectable dans le sucre serait d'environ 1 mg/kg, que la quantité de la protéine CP4 EPSPS dans le sucre est non détectable (limite de détection : 0,004 mg/kg) et que les traitements thermiques (de 55 à 98-130°C) et le pH (de 5.8 à 12) mis en œuvre dans le procédé de fabrication du sucre entraînent une inactivation de la CP4 EPSPS ;

Considérant que les mélasses, qui suivent le même procédé de traitement (température et pH) que le sucre, présentent moins de 0,002ppm de CP4 EPSPS ;

Considérant que dans les pulpes humides, ADN et protéine CP4 EPSPS sont détectables mais qu'en revanche dans les pulpes séchées (>100°C), seule la protéine CP4 EPSP reste détectable ;

(7.8) Toxicologie

(7.8.a) Considérant que la protéine CP4 EPSPS a déjà fait l'objet :

- d'une étude de toxicologie aiguë chez la souris et qu'aucun effet toxique aigu n'a été observé (DL50 : 572 mg/kg p.c.) ;
- de tests de digestion protéolytique *in vitro* et que cette protéine sont rapidement dégradées ;
- de mesures de l'activité enzymatique qui disparaît après 15 minutes à 65 ° C ;
- de comparaison de séquences avec celles de peptides, répertoriés dans des bases de données, connus pour présenter des propriétés toxiques et qu'aucune homologie de séquence n'a été retrouvée avec ces peptides ;

Considérant que le glyphosate ou ses produits de dégradation, notamment l'AMPA, n'ont pas été dosés dans la betterave ;

(7.8.d) Etude de toxicité chez l'animal de laboratoire

Considérant qu'une étude de tolérance et de toxicité subchronique a été réalisée durant 90 jours sur des rats Spargue Dawley des deux sexes (20 rats de chaque sexe/traitement) en vue d'étudier les effets sur l'animal de la consommation de pulpe de betterave H7-1 (deux taux d'incorporation : 2 % et 5 %) comparé à ceux d'une consommation de pulpe de betterave isogénique témoin et de 4 variétés de betteraves conventionnelles de référence, incorporée à 5 % dans la ration alimentaire ;

Considérant que les performances de croissance des animaux, la quantité d'aliment ingéré et des paramètres urinaires et sanguins ont été mesurés au cours de l'étude, qu'au sacrifice à 90 jours, des observations sur les propriétés coagulantes du sang, un examen macroscopique de 10 organes (poids frais) ainsi qu'un examen histologique microscopique sur 22 organes (digestifs, génitaux, glandulaires, reproducteurs) ont été effectués ;

Considérant que :

- aucune différence significative n'a été mise en évidence sur le gain de poids corporel, le sérum et l'urine, entre les animaux nourris avec la betterave H7-1 et la betterave témoin et les variétés de référence,
- des différences significatives ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) sont observées pour les leucocytes, lymphocytes et neutrophiles dans les groupes de rats mâles alimentés avec 2 % ou 5 % de pulpe H7-1 par rapport au groupe témoin de rats mâles,
- une différence sur la masse de la rate, exprimée soit en valeur absolue ou soit relativement au poids corporel, est observée dans le groupe des rats mâles alimentés avec 5 % de pulpe H7-1 par rapport au groupe témoin des rats ;

mais que ces différences se situent dans les fourchettes des valeurs observées pour les 4 variétés conventionnelles de référence et dans les données historiques du laboratoire pour cette souche de rat ;

(7.9) Allergénicité

Considérant que la comparaison de la séquence des acides aminés de la protéine CP4A EPSPS avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ne permet pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de cette protéine ;

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'un essai de digestibilité de la betterave H7-1 a été réalisé sur des moutons nourris pendant 3 semaines avec 30 % de foin et 70 % de betterave (matière sèche) : 5 lots de 7 moutons recevant une des 5 variétés commerciales de référence et 1 lot recevant la betterave H7-1 ;

Considérant que l'analyse de la composition de la ration et des fèces, évaluée par plusieurs variables conventionnelles (MS, % cendres, % protéines, % lipides, % fibres, ADF et NDF) qui permet évaluer la digestibilité des nutriments, montre que tous les nutriments de la betterave H7-1 avaient une digestibilité comparable à celle des variétés conventionnelles de référence sauf pour les lipides dont la teneur s'est révélée plus élevée dans la betterave H7-1 sans que cette différence ait eu un effet sur la digestibilité globale de l'aliment,

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

- le génome de la betterave H7-1 contient une copie unique et intacte du gène *ctp2::cp4 epsps*, à l'exclusion de toute autre séquence du plasmide vecteur ;
- la protéine CP4-EPSPS n'est plus détectable (<0,004 mg/kg) dans le sucre,
- les différences observées dans l'analyse de composition la betterave H7-1 ne remettent pas en cause l'équivalence de composition de la betterave H7-1 à la betterave non génétiquement modifiée ;
- les résultats de l'étude de toxicité subchronique de 90 jours chez le rat ne traduisent pas l'existence d'un risque pour la santé dans la mesure où les différences observées, qui concernent un seul sexe et pour lesquelles il n'y a pas de relation effet-dose, sont dans les limites de variations observées chez les animaux nourris avec les variétés de référence et les données historiques de cette souche de rat ;
- les résultats de digestibilité obtenus chez le mouton montrent une équivalence nutritionnelle de la betterave H7-1 à celle des variétés de référence,

estime que la consommation humaine et animale de betterave H7-1 et ses produits dérivés, notamment le sucre, ne présente pas de risques nutritionnels.

Pascale BRIAND