

Maisons-Alfort, le 13 octobre 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
du coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23 et de ses produits
dérivés, pour l'importation et 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 12 août 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 du coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23 et de ses produits dérivés, pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) n° 1829/2003 (dossier n°EFSA-GMO-NL-2005-16).

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 7 octobre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet l'avis suivant.

(A) Information générale

La présente demande a pour objet la mise sur le marché du coton 281-24-236/3006-210-23 obtenu par croisement conventionnel entre un coton, portant l'événement de transformation 281-24-236, rendu résistant à des insectes par l'introduction du gène *cry1F* et tolérant à un herbicide, le glufosinate, par l'introduction du gène *pat*, avec un coton, portant l'événement de transformation 3006-210-23, rendu résistant à des insectes par l'introduction du gène *cry1Ac* et tolérant au glufosinate par l'introduction du gène *pat*.

Ce coton est destiné à être utilisé en alimentation humaine (huile) et en alimentation animale (tourteaux).

Le coton *Gossypium hirsutum* appartient au genre *Gossypium* dont les espèces sont diploïdes ou allotétraploïdes. Les graines de coton contiennent deux types de composés potentiellement toxiques : le gossypol, qui est un terpénoïde, et des acides gras cyclopropénoïdes. Le gossypol est détoxifié dans le rumen par combinaison avec des protéines. Aussi, les graines ou les tourteaux de coton sont utilisables en alimentation animale des bovins et à plus faible dose chez certains monogastriques.

(C.) Informations relatives à la modification génétique

Considérant que chaque lignée parentale transgénique a été obtenue à l'aide d'une souche désarmée d'*Agrobacterium* portant le vecteur de transformation ;

Evènement 281-24-236

Considérant que le génome du coton portant l'évènement de transformation 281-24-236 comprend :

- le promoteur (4OCS)DeltaMas 2' (609 pb)
- le gène *cry1F* (3447 pb)
- le terminateur bi-directionnel ORF25PolyA (727 pb)
- le promoteur UbiZm1 (1993 pb ; origine: *Zea mays*)
- le gène *pat* (552 pb)
- le terminateur ORF25PolyA ;

Considérant que le génome du coton 281-24-236 contient également une seconde cassette localisée au niveau de la bordure droite en 3' de l'insertion de la cassette *cry1F*, formée du :

- promoteur UbiZm1 (1993 pb ; origine: *Zea mays*)
- gène tronqué *pat* (231 pb) ;

située en orientation inverse de la copie intacte du gène *pat* ;

Considérant que le vecteur de transformation pAGM281, qui contenait un gène bactérien codant la résistance à l'érythromycine *eryR*, n'a pas été transféré (vérification par Southern blot) ;

Evènement 3006-210-23

Considérant que le génome du coton portant l'évènement de transformation 3006-210-23 comprend :

- le promoteur UbiZm1 (1993 pb ; origine: *Zea mays*)
- le gène *cry1Ac* (3471 pb)
- le terminateur bi-directionnel ORF25PolyA (727 pb)
- le promoteur (4OCS)DeltaMas 2' (609 pb)
- le gène *pat* (552 kbp)
- le terminateur ORF25PolyA.

Considérant que le vecteur de transformation pMYC3006, qui contenait un gène bactérien codant la résistance à l'érythromycine *eryR*, n'a pas été transféré (vérification par Southern blot) ;

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (2) Considérant que l'hybride 281-24-236/3006-210-23 résulte du croisement conventionnel des deux lignées de coton 281-24-236 et 3006-210-23 ;

Considérant que le génome du coton hybride 281-24-236/3006-210-23 contient deux inserts localisés sur des chromosomes différents, l'un contenant une copie intacte du gène *cry1F* et du gène *pat* ainsi qu'une copie tronquée (231 pb) du gène *pat* et une copie complète de son promoteur UbiZm1, l'autre contenant une copie intacte du *cry1Ac* et du gène *pat* et que ces insertions ont été vérifiées par Southern blot ;

Considérant que le séquençage des insertions et de leurs bordures 5' et 3' dans la plante révèle que :

pour l'évènement 281-24-236

- la séquence du transgène est rigoureusement identique à celle attendue, à l'exception de 2 mutations situées dans la région promotrice UbiZm1 (l'insert a perdu la base T en position 2636 et a incorporé une base C additionnelle en position 3339) ;
- le séquençage confirme l'existence additionnelle et partielle d'une cassette supplémentaire contenant l'intégralité du promoteur UbiZm1 et le gène *pat* tronqué de 231 bp. Cette cassette partielle du gène *pat* se situe en aval de la bordure droite de l'ADN-T, à l'extrémité 3' de la séquence complète du transgène, et en orientation opposée par rapport à la cassette *pat* du transgène ;

- l'analyse informatique des régions de bordure en 5' (2071 pb) et en 3' (2902 pb) révèle une homologie avec le gène GA20ox1 de la gibberelline 20-oxidase ; l'intégration s'est faite probablement dans une séquence 3'-UTR de ce gène putatif ; l'insertion n'interrompt pas la région codante de la GA 20-oxidase, mais dès lors qu'elle intervient dans une séquence 3'-UTR, elle peut potentiellement perturber l'expression de la GA 20-oxidase ;
- au niveau du site d'insertion, le processus d'intégration du transgène a conduit à la délétion de 53 pb dans le locus qui a accueilli le transgène ;

pour l'événement 3006-210-23

- la séquence du transgène est rigoureusement identique à celle attendue ;
- l'analyse informatique des régions de bordure en 5' (535 pb) et en 3' (482 pb) de l'insert ne révèle aucune homologie avec des séquences répertoriées dans les banques de données ; cette analyse ne permet pas d'identifier la région dans laquelle s'est faite l'intégration mais la région du locus concernée par l'intégration n'était porteuse d'aucune ORF (open reading frame).;
- au niveau du site d'insertion, le processus d'intégration du transgène a conduit à la délétion de 16 pb dans le locus qui a accueilli le transgène ;

Considérant que la recherche des ORF, dans les 6 cadres de lecture possibles par l'analyse informatique des séquences à la jonction entre l'insertion et le génome de la plante a mis en évidence que :

pour l'événement 281-24-236

- les 231 pb de la séquence partielle du gène *pat* plus 24 bp de la bordure droite (ADN-T bordure B) forment une ORF de 255 bp (85 acides aminés) ; la comparaison de cette séquence avec des séquences connues et répertoriées dans les bases de données montre que, si cette séquence était traduite, elle correspondrait à 77 acides aminés de la protéine PAT à son extrémité N-terminale et à 8 acides aminés à son extrémité C-terminale ; l'expression de la protéine PAT tronquée, étudiée par RT-PCR, montre que son niveau de transcription dans les cotylédons est au moins 16 fois moins important que celui de la protéine PAT native ; l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine PAT native, mais présentant une très bonne affinité pour la protéine PAT tronquée (limite de détection de l'ordre du picogramme) ne permet pas de détecter la protéine PAT tronquée dans les tissus de coton analysés ;
- une ORF (ORF-7) de 57 acides aminés à l'extrémité 5' a été identifiée mais que la séquence du peptide putatif, déduit de cette ORF, ne présente pas d'homologies avec celles de peptides connus pour présenter des effets toxiques, immunologiques ou allergéniques ou avoir une activité pharmacologique ;

pour l'événement 3006-210-23, trois nouvelles ORF : l'ORF-3 (57 acides aminés), l'ORF-4 (17 acides aminés) et l'ORF-10 (53 acides aminés) ont été identifiées mais que les séquences des peptides putatifs, déduits de ces 3 ORF, ne présentent d'homologies avec celles de 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 des protéines Cry1F, Cry1Ac et PAT (méthode ELISA), réalisé dans les différents tissus de la plante 281-24-236/3006-210-23 et de chacun des parents, cultivées aux Etats-Unis en 2001 et 2003 (6 sites) montrent que le niveau d'expression des protéines introduites mesurées dans les graines triturées (tableau) est homogène pour ces deux années de culture et est conforme à ce qui pouvait être attendu au regard de l'expression de ces protéines dans les lignées parentales ;

Tableau : Niveau d'expression des protéines Cry1F, Cry1Ac et PAT dans les graines de coton triturées

Coton (graines triturées)	ng protéine/mg de poids frais de tissu		
	Cry1F	Cry1Ac	PAT
Année de culture : 2001			
Coton 281-24-236	3.3	NA ^a	0.42
Coton 281-24-236/3006-210-23	3.1	0.46	0.53
Coton 3006-210-23	NA	0.62	(0.09) ^b
Année de culture : 2003			
Coton 281-24-236	2.27	NA ^a	0.43
Coton 281-24-236/3006-210-23	2.34	0.46	0.53
Coton 3006-210-23	NA	0.43	(0.04) ^b

^a ND = Non applicable.

^b Valeurs in () = Concentration calculée est inférieure à la LOQ de la méthode.

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

Considérant que la stabilité des insertions a été vérifiée sur plusieurs générations, dans différents fonds génétiques et dans diverses conditions de culture ;

Considérant que les résultats d'analyse par Southern blot montrent que les deux événements sont hérités correctement chez l'hybride, que le phénotype de résistance aux insectes (lépidoptères) apporté par les protéines Cry1F et Cry1Ac est transmis à la descendance comme un caractère mendélien dominant et que la structure de l'ADN-T dans l'hybride 281-24-236/3006-210-23 s'avère inchangée par rapport à celle des parents ;

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

(7.1-3) Considérant que la composition chimique de la graine et des produits transformés (tourteau et huile raffinée) du coton 281-24-236/3006-210-23 a été comparée à celle des parents 281-24-236 et 3006-210-23 et à celle d'un coton témoin non génétiquement modifié (semence issue de la génération F1 non transformée) ; une soixantaine de composants ont été analysés sur des échantillons récoltés aux Etats-Unis sur 6 sites (3 répétitions par site) en 2001 et 2003, dont humidité, protéine brute, matière grasse, cendres, NDF, ADF, acides aminés, acides gras, calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc, deux facteurs toxiques et anti-nutritionnels (gossypol et acides cyclopropénoïdes) et les aflatoxines ;

Considérant que les résultats obtenus ont fait l'objet de deux traitements statistiques, l'un qui considère l'ensemble des données de tous les sites et répétitions et l'autre qui considère les données des 3 répétitions par site ;

Considérant que :

- les quelques différences statistiquement significatives ($p < 0.05$) relevées en 2001 et 2003 sont observées entre les valeurs de la littérature et les valeurs mesurées chez le témoin, les lignées parentales 281-24-236 et 3006-210-23 et le coton hybride, indiquant que ces différences ne sont pas liées aux modifications génétiques présentes dans l'hybride 281-24-236/3006-210-23 ;
- les teneurs en gossypol et en acides cyclopropénoïdes ne sont pas différentes entre le coton témoin et l'hybride 281-24-236/3006-210-23, que la teneur en gossypol libre est inférieure à la limite de détection dans l'huile raffinée et que les teneurs en aflatoxines sont inférieures aux limites de détection dans les différentes matrices, ces résultats permettent de considérer que le coton hybride présente une composition équivalente à celle du coton témoin non génétiquement modifié ;

(7.8) **Toxicologie**

- (7.8.1) Considérant que les résultats d'une étude de toxicité aiguë, réalisée chez des souris à qui une dose unique d'un mélange des protéines Cry1F (375 mg/kg p.c.) et Cry1Ac (350 mg/kg p.c.) a été administrée par gavage, n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes ni de mortalité après 14 jours d'observation ;

Considérant que les résultats d'une étude de toxicité aiguë, réalisée chez des souris à qui une dose unique de la protéine PAT (5000 mg/kg p.c.) a été administrée par gavage, n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes ni de mortalité après 14 j d'observations ;

(7.9) **Allergénicité**

Considérant que les observations suivantes ne permettent pas de suspecter l'existence d'un potentiel allergénique de ces protéines :

- les protéines Cry1F et Cry1Ac ne sont pas glycosylées lorsqu'elles sont exprimées dans le coton ;
- les tests de digestion protéolytique en fluide gastrique et intestinal simulé montrent que les protéines Cry1F et Cry1Ac et PAT sont rapidement dégradées ;
- les séquences des acides aminés des protéines Cry1F, Cry1Ac et PAT ne présentent pas de similitude avec des séquences de protéines connues pour être allergènes ou immunologiquement actives ;

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 que l'analyse de composition de l'hybride n'a pas mis en évidence de différences significatives sortant des fourchettes de variations habituelles des composants analysés (voir 7.1-3) ;

Considérant qu'un essai d'alimentarité a été réalisé sur 480 poulets (120 animaux par traitement, soit 12 répétitions avec 5 mâles et 5 femelles par répétition) nourris (10 % de la ration alimentaire) pendant 42 jours avec du tourteau de coton hybride 281-24-236/3006-210-23, que 4 paramètres zootechniques ont été suivis : mortalité, gain de poids, consommation alimentaire et taux de conversion et que des analyses ont été faites sur les différentes parties de la carcasse pour estimer leurs valeurs transformées ;

Considérant que les données relatives à ces 4 paramètres zootechniques ont été comparées à celles obtenues chez des poulets nourris dans les mêmes conditions avec un tourteau coton témoin (isogénique) et 2 variétés commerciales ;

Considérant que l'analyse globale des paramètres zootechniques montre que :

- pour la période 0-21 jours de croissance du poulet, on observe un gain de poids plus important pour les poulets nourris le coton hybride 281-24-236/3006-210-23 que ceux nourris avec le coton témoin ou les variétés commerciales,
- cette différence disparaît pour la période 29-42 jours et sur la durée totale de l'étude (0-42 j) ;

Considérant cependant qu'aucune donnée détaillée des paramètres zootechniques suivis permettant d'évaluer le bien fondé des conclusions avancées par le pétitionnaire n'est fournie et que les résultats des analyses annoncées concernant la valeur transformée des produits ne figurent pas dans le dossier,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère qu'il conviendrait de disposer des données individuelles et de l'analyse statistique correspondante pour l'étude d'alimentarité chez le poulet pour s'assurer que la consommation de coton 281-24-236/3006-210-23 et ses

dérivés présente le même niveau de sécurité sanitaire pour l'animal que celle d'un coton non génétiquement modifié.

Concernant l'huile destinée à l'alimentation humaine, l'Afssa estime, qu'au regard des résultats de l'analyse de composition chimique fournie dans le dossier initial, l'huile issue de coton 281-24-236/3006-210-23 présente le même niveau de sécurité sanitaire que l'huile issue d'un coton non génétiquement modifié.

Pascale BRIAND