

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à une demande de mise sur le marché d'une pomme de terre génétiquement modifiée AV43-6-G7, développée afin de contenir une teneur moindre en amylose, pour la culture, l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM, au titre du règlement (CE) n°1829/2003.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le lundi 24 janvier 2011 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis relatif à une demande de mise sur le marché de la pomme de terre génétiquement modifiée AV43-6-G7, développée afin de contenir une teneur moindre en amylose, pour la culture, l'importation et la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM, au titre du règlement (CE) n°1829/2003 (**dossier EFSA-NL-2009-69**).

2. CONTEXTE

Conformément au Règlement (CE) N°1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) 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'EFSA 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'Anses.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective été réalisée par le Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 mars 2011.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire suit les sections des lignes directrices de l'EFSA relatives aux demandes d'autorisation de mise sur le marché d'OGM pour l'importation et l'utilisation en alimentation humaine et animale, au titre du règlement (CE) N°1829/2003.

(A) Information générale

L'amidon de pomme de terre est "naturellement" constitué d'un mélange d'amylose (15-30 %, polymère linéaire du glucose branché en α 1-4) et d'amylopectine (70-85%, polymère branché en α 1-4 et en α 1-6). L'amylopectine a des propriétés particulières de rétention d'eau, est antigluante et anticollante. L'amylose est plus structuré, insoluble dans l'eau et de ce fait moins digeste. La réduction de la teneur en amylose confère à l'amidon des propriétés technologiques industrielles intéressantes, notamment pour l'industrie du papier. L'amidon est également utilisé à l'état natif ou après transformation dans l'alimentation humaine et animale.

La pulpe, riche en matière sèche est valorisée en tant que co-produit en alimentation animale, exclusivement pour les animaux ruminants (bovins), tandis que les parties non comestibles sont utilisées comme compost ou pour la production de méthane par fermentation.

L'objectif de la transformation génétique AV43-6-G7 est d'inhiber la synthèse d'amylose pour obtenir un amidon quasi pur en amylopectine. Ce caractère génétique a déjà été obtenu par sélection génétique classique. Il est présent dans des variétés de pomme de terre dont la grande sensibilité à des pathogènes les rendent impropres à la culture car elles nécessiteraient l'utilisation de produits phytosanitaires non autorisés dans l'UE.

Le dossier qui correspond à une première demande de mise sur le marché selon le règlement CE N°1829/2003, revendique toutes les applications d'une variété de pomme de terre destinée à la production d'amidon dont la destination principale est l'utilisation industrielle non alimentaire de l'amidon.

Le dossier permet aussi d'évaluer le risque lié à la présence fortuite de tubercules dans l'alimentation humaine et animale.

(C) Informations relatives à la modification génétique

La transformation a été réalisée dans la pomme de terre de la variété Karnico¹ par *Agrobacterium tumefaciens* souche AGL0.

Le plasmide de transfert peut être propagé dans *E coli* et *A tumefaciens* et contient un ADN-T délimité par une bordure droite et gauche. La sélection des bactéries est possible grâce au gène *nptIII* (qui lui confère la résistance aux antibiotiques du groupe des amino-glycosides) situé en dehors des séquences de l'ADN-T.

L'ADN-T comporte :

- le promoteur du gène *gbss* (permet une expression intense dans les tubercules, le pollen et la pointe racinaire) ;
- la partie 5' de l'ADNc (1.1kb) du gène *gbss* en orientation sens ;
- l'ADNc complet de *gbss* inséré en orientation antisens ;
- la séquence de polyadénylation de 254 pb du gène de la nopaline synthétase (*nos*) d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le gène *gbss* est un gène de pomme de terre codant pour une synthétase de l'amidon GBSS I (Granule Bound Starch Synthétase I).

Ainsi, l'expression de la cassette permet la formation d'une structure en épingle à cheveu qui par un mécanisme d'ARN interférence cible la partie 5' du transcrit GBSSI et conduit à l'inhibition de l'expression de la synthétase endogène afin de réduire la quantité d'amylose synthétisée.

(D) Informations relatives à la plante génétiquement modifiée

- (1) Le caractère « amidon sans amylose » est obtenu par l'inhibition de la synthèse de l'enzyme GBSSI en exprimant la séquence 5' de l'ADNc de GBSSI en orientation répétée inversée.

¹ La variété Karnico est une pomme de terre destinée à la production d'amidon et couramment utilisée par le pétitionnaire pour cet usage.

- (2) Le cultivar Karnico est utilisé comme témoin pour les analyses moléculaires. Les résultats d'une analyse par Southern blot, en utilisant 7 enzymes de restriction et 4 sondes internes à la construction génétique, montrent qu'une seule copie de l'ADN-T est insérée dans l'évènement AV43-6-G7 avec une délétion au niveau des bordures droite et gauche. Les résultats des analyses par PCR et Southern blot montrent qu'aucune séquence correspondant au squelette plasmidique n'est insérée dans l'évènement AV43-6-G7.

La séquence complète de l'insert de l'évènement AV43-6-G7 ainsi que la séquence des régions en bordure droite et gauche a été déterminée.

Les résultats montrent :

- une délétion de 237 pb au sein de la bordure droite ;
- une délétion de 1056 pb éliminant la bordure gauche et le site de polyadénylation du gène *nos*.

Ainsi, le signal de terminaison de la transcription (*nos*) n'est pas présent dans le transgène. Il aurait donc été souhaitable que la caractérisation moléculaire du transcrit en particulier en 3' (site d'arrêt de transcription, taille de l'ARNm) soit plus détaillée.

L'insert représente 4776 pb des 6069 pb de l'ADN-T du plasmide de transformation. L'intégrité de la séquence intégrée a été vérifiée. Les séquences insérées dans l'évènement AV43-6-G7 ont pour origine le génome de la pomme de terre à 95 % (promoteur GBSSI et ADNc GBSSI), le reste étant des séquences artificielles (multi-sites de clonage) ou d'origine procaryote (*lacI* de l'opéron lactose). L'analyse des séquences génomiques de part et d'autre de l'insert (403 pb à droite et 1497 pb à gauche) montre une délétion de 1814 pb au locus d'insertion dans l'évènement AV43-6-G7.

L'analyse informatique des 3714 pb du locus d'insertion met en évidence une homologie avec un EST² de pomme de terre (*solanum tuberosum*) ainsi qu'un signal de polyadénylation. Selon l'alignement, l'EST serait tronqué en 3' de 20% de sa séquence. La pomme de terre Karnico étant tétraploïde, la perte éventuelle de fonction d'une protéine peut être compensée par les 3 autres *loci*.

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

La cassette d'expression des fragments sens/antisens de la partie 5' de l'ADNc de GBSSI est sous le contrôle des séquences de régulation naturelles. L'insert est comme attendu transcrit dans les mêmes tissus que le gène endogène de l'enzyme.

La recherche de cadres de lecture ouverts (ORF, d'un codon start à stop) a été réalisée sur l'ensemble de la région d'insertion de l'ADN-T et des séquences flanquant l'insert. La recherche d'homologie a été réalisée en interrogeant plusieurs bases de données de séquences protéiques utilisant l'outil BLASTP³ et la base de données des allergènes⁴. La majorité des ORF identifiés correspondent à la séquence codante de GBSSI, ou à la séquence du promoteur GBSSI. Deux ORF, chevauchant les séquences de bordure et de l'ADN-T, ont été également prédits, l'un de 152 acides aminés (AA) correspond à une fusion possible entre la séquence EST identifiée au point 2 et les derniers 24 AA du répresseur *lacI* (à l'extérieur du domaine fonctionnel) et la seconde de 60 acides aminés provenant d'une phase de lecture différente de l'ORF précédent. Aucune de ces ORF ne présente d'homologie avec des protéines toxiques ou allergéniques.

La recherche de peptides de fusion (éventuellement formés au niveau des jonctions) a été réalisée par analyse des séquences d'ADN (traduction d'une séquence nucléotidique d'un codon stop à un codon stop) dans les 6 cadres de lecture pour les deux jonctions 5' et 3'. Ainsi, onze ORF putatifs ont été identifiés et analysés pour rechercher des éventuelles homologies avec les protéines connues à l'aide de l'outil BLASTP ainsi qu'avec la base de données spécifiques des allergènes. Une des séquences (côté droit) présente des homologies non suivies (environ 30% d'identité sur 100 acides aminés) avec celle d'un allergène connu. Il s'agit d'une protéine de la fléole des prés (*Phleum pratense*). Toutefois, la zone d'alignement concerne exclusivement des séquences

² EST expressed sequence tag, marqueur de séquence exprimée.

³ BLASTP 2.2.24+

⁴ AllergenOnline Database v10.0 (January, 2010)

dérivées du génome de la pomme de terre. De plus, l'alignement n'est pas retrouvé en utilisant BLASTP.

Une analyse de l'accumulation de l'enzyme GBSSI endogène et de celle issue de l'expression du transgène a été réalisée par transfert de Western à partir de tubercules de Karnico et d'AV43-6-G7. Les résultats montrent l'inhibition de la production de l'enzyme GBSSI endogène et l'absence d'une protéine GBSSI qui aurait pu provenir de l'expression du transgène dans l'événement AV43-6-G7.

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

La stabilité de l'insertion de l'ADN-T a été vérifiée par Southern blot à partir de différents tissus et au cours de plusieurs générations végétatives lors des saisons 2001, 2005 et 2007.

Les résultats d'une analyse par Southern blot de plantes issues de croisement entre la variété FESTIEN (plante femelle) et AV43-6-G7 (plante mâle) confirment que l'insertion s'est produite dans le génome nucléaire de la pomme de terre.

La ségrégation mendélienne du caractère « sans amylose » a été étudiée sur des pommes de terre provenant de croisements avec des variétés non génétiquement modifiées. L'analyse des clones montre que le caractère « sans amylose » est lié selon une proportion 1:1 à la présence de l'ADN-T suggérant que son intégration est stable au cours de la méiose.

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

(7.1-3) Analyse comparée de composition

Pour cette analyse, des essais de culture en champ ont été effectués au cours de 3 saisons (2004, 2005 et 2006) sur 8 sites différents aux Pays-Bas. La variété AV43-6-7G (ou Modena) et la variété de référence Karnico non génétiquement modifiée et prise comme comparateur ont été cultivées conjointement en triplicata sur les mêmes sites avec d'autres variétés commerciales.

Certains champs ayant été détruits par des activistes en 2004 et 2005, les données analysées ne proviennent que de 5 et 6 sites respectivement ces deux années.

Les substances, dont la concentration a été mesurée, sont celles recommandées par l'OCDE (OCDE 2002⁵). Il s'agit de quatre macro-éléments (amidon, protéines totales, protéines coagulables, sucres) qui représentent 80-90% de la matière sèche des pommes de terre, du potassium, des glycoalcaloïdes. La vitamine C et l'acide chlorogénique ont aussi été mesurés bien que ces substances soient détruites au cours du procédé d'extraction de l'amidon.

Sur les échantillons provenant des saisons 2002 et 2006, l'analyse a aussi porté sur les éléments suivants : α -solanine, α -chaconine, glycoalcaloïdes totaux, glucose, fructose, saccharose, sucres totaux, nitrates, 4 cations inorganiques, acides gras totaux, fibres, acide chlorogénique, vitamine C, lactate, acétate, citrate, acides aminés totaux, 17 acides aminés, acide butyrique, ornithine, histidine et activité d'inhibiteur de la trypsine.

L'analyse statistique comprend une analyse descriptive et une analyse de variance prenant en compte l'influence de l'année, du lieu et de l'événement de transformation. Des outils d'analyse multivariée ont aussi été employés. Les données de la variété AV43-6-7G ont été comparées à celles de la variété Karnico choisie comme comparateur. Les intervalles des valeurs obtenues à partir des variétés commerciales et des données de la littérature sont présentés.

L'analyse de variance montre que les variations résultent essentiellement des effets environnementaux (lieux de culture et climat spécifique de l'année).

Comme attendu, les différences significatives observées (p -value<0.05) concernent la teneur en amidon total (plus faible dans la variété AV43-6-7G que dans Karnico), les teneurs des trois principaux hydrates de carbones libres (glucose, fructose et saccharose) et totaux (plus élevées dans la variété AV43-6-7G que dans Karnico) et les protéines coagulables. Pour les sucres totaux et les protéines coagulables, les données fournies des variétés commerciales cultivées aux Pays-Bas permettent de constater que les valeurs moyennes observées restent dans l'intervalle de ces variétés de référence.

⁵ ENV/JM/MONO(2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants.

Des différences significatives sont observées pour les teneurs des substances toxiques ou ayant des propriétés anti-nutritionnelles connues. Les valeurs moyennes obtenues pour la pomme de terre AV43-6-7G sont toujours inférieures ou égales à celles de la variété de référence.

(7.4) Analyse comparée des caractères agronomiques

Les caractères agronomiques (développement du feuillage, maturité, poids et contenu des tubercules, rendement en amidon, sensibilité aux maladies) ont été mesurés sur les plantes AV43-6-7G et Karnico cultivées dans les essais décrits ci dessus pour l'analyse de composition. Des différences en production d'amidon sont observées pour les deux variétés entre les sites et les années. Le niveau moyen de production en amidon pour les deux variétés se situe par ailleurs dans l'intervalle des valeurs observées chez les variétés commerciales. Aucune autre différence de comportement agronomique n'a été observée par rapport à la variété de référence.

(7.6) Effet du procédé de traitement

Les produits issus de la variété AV43-6-7G sont préparés selon les méthodes courantes utilisées pour les variétés conventionnelles déjà existantes et présentant le même caractère (amidon quasi pure en amylopectine).

Étant donné la nature de la transformation génétique, le traitement ne doit pas avoir d'impact sur la composition des co-produits issus de AV43-6-7G. Une évaluation de ces aspects n'apparaît pas nécessaire.

(7.7) Utilisation et consommation prévue

Des données d'exposition pour l'homme et l'animal (vaches laitières, veaux, porcs, porcelets, volailles, poissons, visons, animaux familiers) aux différents produits issus des variétés de pommes de terre destinées à la production d'amidon ont été calculées en fonction de l'utilisation connue (LMC international 2002) de ce type de produits dans l'alimentation humaine et animale.

(7.8) Toxicologie

Aucune protéine n'est nouvellement synthétisée dans la pomme de terre AV43-6-7G. L'enzyme Granule bound starch synthétase (GBSSI) n'est plus produite en raison de l'inhibition de l'expression de son gène.

Par rapport à la variété de référence, la composition chimique de la pomme de terre AV43-6-7G est modifiée comme attendu. La nature des composés concernés et le sens de la variation ne sont pas susceptibles d'avoir de conséquence sur la sécurité sanitaire.

(7.8.4) Etude de toxicité sub-chronique

Afin d'évaluer la sécurité de la pomme de terre entière, une étude de toxicité sub-chronique de 90 jours sur rats Wistar, selon la ligne directrice 408 de l'OCDE, a été réalisée dans un laboratoire accrédité Bonne Pratique de Laboratoire (BPL).

L'étude comporte 4 groupes de 20 mâles et 20 femelles: un groupe contrôle dont le régime ne contient pas de pomme de terre, un groupe de référence dont le régime contient 30%⁶ de pommes de terre Karnico crue et lyophilisée et deux groupes dont le régime contient respectivement 15 et 30% de pomme de terre AV43-6-7G crue et lyophilisée. La composition des différents régimes a été analysée en ce qui concerne l'amidon, la matière sèche, l'humidité, les fibres, les protéines, les cendres et trois minéraux. Celle-ci est proche dans tous les régimes, à l'exception du potassium. L'analyse statistique (analyse de variance ou comparaison multiple Dunnett, p-value<0.05) a consisté à comparer d'une part, les résultats du groupe de référence (Karnico) et des groupes de AV43-6-7G (15 et 30%) au groupe témoin (régime normal sans pomme de terre) et d'autre part les résultats des groupes Karnico et AV43-6-7G à ceux du groupe de référence (régime sans pomme de terre).

Concernant la mortalité, les modifications du comportement et l'examen ophtalmologique, les observations n'indiquent pas de relation avec le traitement. L'observation du comportement et l'activité motrice n'ont pas révélé de potentiel neurotoxique de la pomme de terre testée.

⁶ Un taux d'incorporation de 30% pour le rat est équivalent à la consommation par jour et pour un homme de 60kg de 990g de pomme de terre lyophilisée ou de 4 kg de pomme de terre en poids frais.

Concernant la consommation et la croissance des animaux, la consommation de nourriture chez les rats mâles nourris avec de la pomme de terre transgénique ou non a été retrouvée plusieurs fois significativement plus élevée que chez les rats témoins. Celle des rats femelles l'a été également, mais uniquement dans les groupes nourris avec la pomme de terre AV43-6-7G.

De même, la consommation hydrique a été plus élevée chez les animaux des groupes de référence Karnico et AV43-6-7G (15 et 30%) par rapport au groupe contrôle (sans pomme de terre).

De nombreuses différences significatives ont été observées entre les groupes recevant un régime contenant les pommes de terre et le groupe contrôle (régime sans pomme de terre). Ces différences concernent de nombreux paramètres hématologiques et de biochimie sanguine, quelques paramètres urinaires et de poids d'organes. De plus, les examens macro et microscopiques révèlent certaines anomalies au niveau de la *lamina propria* du *caecum* chez les animaux nourris avec des pommes de terre.

Les autres différences significatives observées concernent surtout les groupes ayant reçu la pomme de terre AV43-6-7G à 15% comparé au groupe de référence ayant reçu la pomme de terre Karnico à 30%. Elles ne sont pas observées entre les deux groupes aux mêmes doses. Elles semblent être la conséquence d'une différence de dose entre les deux groupes et ne sont donc pas considérées comme liées à la modification génétique.

En conclusion, les régimes contenant les pommes de terre aux doses utilisées (15 et 30%) conduisent à des modifications biologiques par rapport aux groupes nourris sans pomme de terre. L'observation de ces modifications ne semble pas liée à l'événement de transformation, puisque les modifications sont indifféremment observées dans tous les groupes recevant un régime avec pomme de terre.

Cependant, il eut été utile d'évaluer les effets de doses plus faibles permettant de déterminer une dose sans effet.

(7.9) Allergénicité

L'évaluation de l'allergénicité n'apparaît pas nécessaire par rapport au risque lié à la présence d'une protéine nouvellement synthétisée puisqu'aucune protéine n'est nouvellement synthétisée dans la pomme de terre AV43-6-7G.

Les séquences insérées proviennent principalement de la pomme de terre qui est l'organisme donneur.

L'amidon, utilisé dans de nombreuses applications alimentaires, n'est pas connu pour induire des effets allergiques. Cet amidon dérivé de la pomme de terre AV43-6-7G ne devrait pas présenter un risque différent de l'amidon issu d'une pomme de terre conventionnelle.

(7.10) Evaluation nutritionnelle

Aucune étude nutritionnelle sur animaux cibles n'est présentée.

Un plan de surveillance de l'utilisation de cette variété AV43-6-7G dans l'alimentation animale est proposé.

5. CONCLUSION

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail considère que pour se prononcer sur la sécurité sanitaire de la pomme de terre AV43-6-7G, il eut été nécessaire de fournir :

- la caractérisation moléculaire du transcrit en particulier en 3',
- une étude d'alimentarité chez une espèce cible avec les sous produits destinés à l'alimentation animale.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

6. MOTS CLES

OGM, pomme de terre, AV43-6-7G, amidon, amylose, ARNi, GBSSI