

COMMISSION DU Génie BIOMOLECULAIRE

Paris, le - 1 DEC. 2004

AVIS

La Commission du génie biomoléculaire a été saisie, le 11 octobre 2004, par les autorités compétentes françaises (Direction générale de l'alimentation) d'une demande d'avis relative à un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché d'un coton génétiquement modifié, tolérant à l'herbicide glufosinate d'ammonium et résistant à certains insectes, pour l'importation et la transformation industrielle, dans l'Union Européenne.

La Commission du génie biomoléculaire réunie en séance plénière le 9 novembre et le 1^{er} décembre 2004, sous la présidence du Professeur Marc FELLOUS, a procédé à l'examen du dossier déposé par AGRIGENETICS relatif à « la **DEMANDE DE MISE SUR LE MARCHÉ des graines de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23** », au titre de l'article 15 de la directive 2001/18/CE (partie C). Ce dossier a été déposé pour l'évaluation initiale auprès des autorités compétentes néerlandaises sous la référence **C/NL/04/01**.

Ce dossier correspond à la demande d'autorisation de mise sur le marché de coton génétiquement modifié de la société AGRIGENETICS, conformément aux informations requises par les annexes II, III, IV et VII de la directive 2001/18/CE et appendices contenant les détails des études sur l'OGM relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé publique et l'environnement.

La Commission du génie biomoléculaire a considéré les caractéristiques des séquences introduites et a procédé à l'évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement. Cette évaluation ne porte pas sur l'utilisation intentionnelle des graines de coton en alimentation humaine ou animale, un dossier spécifique pour ces usages devant être déposé dans le cadre du règlement 1829/2003.

1. Introduction :

Le dossier scientifique de demande d'autorisation de mise sur le marché de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23 de la société AGRIGENETICS contient les informations requises par les annexes de la directive 2001/18/CE relatives à l'évaluation de la sécurité sur la santé publique et l'environnement que présente l'OGM. Un rapport d'évaluation des autorités néerlandaises a été transmis avec le dossier scientifique.

2. Utilisation :

La demande d'autorisation porte sur l'importation et la transformation industrielle de graines de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23. La demande ne concerne pas la culture ni l'utilisation en alimentation humaine ou animale. L'utilisation des graines de coton et des produits dérivés en alimentation humaine ou animale fera l'objet d'une demande dans le cadre du règlement 1829/2003 et sera évaluée dans ce cadre.

3. Description du produit :

La lignée de cotonnier (*Gossypium hirsutum*) transgénique 281-24-236/3006-210-23 a été obtenue par croisement classique entre deux lignées transgéniques, chacune au stade BC3F1. La lignée 281-24-236 a été modifiée pour contenir les gènes *cry1F(synpro)* et *pat*, alors que la lignée 3006-210-23 contient les gènes *cry1Ac(synpro)* et *pat*. La lignée 281-24-236/3006-210-23 est une lignée pyramidée qui exprime les gènes conférant une résistance à certains lépidoptères ravageurs du cotonnier *cry1Ac(synpro)* et *cry1F(synpro)*, ainsi que le gène *pat*, présent en deux copies, qui confère une tolérance, notamment lors du processus de transformation génétique, au glufosinate d'ammonium.

3-1) Méthode de transformation :

Les lignées 281-24-236 (*cry1F*) et 3006-210-23 (*cry1Ac*) ont été obtenues par transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens*, souche LBA4404, à l'aide des vecteurs pAGM281 et pMYC3006 respectivement, et sélection des cellules transformées par le glufosinate d'ammonium (gène de sélection *pat*).

3-2) Description moléculaire et génétique

a) les plasmides :

Les vecteurs de transformation dans *Agrobacterium tumefaciens* sont les plasmides pAGM281 et pMYC3006.

Le vecteur pAGM281, comporte les éléments suivants, entre les bordure de l'ADN-T :

- 4(ocs) Δ Mas2' : promoteur de la mannopine synthase dérivé du plasmide pTi15955 d'*A. tumefaciens* avec 4 copies de l'enhancer de l'octopine synthase du plasmide pTiACh5
- *cry1F(synpro)* : version synthétique optimisée pour l'expression dans les plantes du gène de la séquence Cry1F dérivée de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, comprenant la séquence codante de la portion toxique de *cry1Fa2* (nucléotides 1 à 1810), une portion de la protoxine Cry1C (n. 1811 à 1917) et une portion de la protoxine Cry1Ab (n. 1918 à 3447).
- Orf25 polyA : terminateur bi-directionnel du plasmide pTi15955 d'*A. tumefaciens*
- *pat* : version synthétique du gène de résistance au glufosinate d'ammonium dont les codons ont été optimisés pour expression chez les plantes dérivé de la séquence de la phosphinothricine acétyl transférase de *Streptomyces viridochromogenes* ;
- UbiZm1 : le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs comprenant également le premier exon (non traduit) et le premier intron (GenBank Accession 138571).

Le vecteur pMYC3006, comporte les éléments suivants, entre les bordure de l'ADN-T :

- UbiZm1 : le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs comprenant également le premier exon (non traduit) et le premier intron (GenBank Accession 138571).
- *cry1Ac(synpro)* : version synthétique optimisée pour l'expression dans les plantes du gène de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, comprenant la séquence codante de la portion toxique de Cry1Ac1 (nucléotides 1 à 1844), une portion de la protoxine Cry1C (n. 1845 à 1951) et une portion de la protoxine Cry1Ab1 (n. 1952 à 3481) ;
- Orf25 polyA : terminateur bi-directionnel du plasmide pTi15955 d'*A. tumefaciens*
- *pat* : version synthétique du gène de résistance au glufosinate d'ammonium dont les codons ont été optimisés pour expression chez les plantes dérivé de la séquence de la phosphinothricine acétyl transférase de *Streptomyces viridochromogenes*.
- 4(ocs) Δ Mas2' : promoteur de la mannopine synthase d'*A. tumefaciens* pTi15955 avec 4 copies de l'enhancer de l'octopine synthase du plasmide pTiACh5.

b) Construction génétique introduite dans l'OGM :

L'insertion dans le génome du cotonnier qui correspond à l'événement 281-24-236 comprend de 5' en 3' l'ADN-T complet du plasmide pAGM281 (cassette PAT + Cry1F)

auquel s'est ajoutée en 3' une copie inversée d'une portion de ce plasmide portant le promoteur *ubi-1* et une partie de la séquence codante (231 pb) de la protéine PAT. Une délétion de 53 pb s'est produite dans le génome de la plante au site d'insertion.

L'insertion qui correspond à l'événement 3006-210-23 comprend de 5' en 3' une duplication partielle du terminateur de l'ORF 25, suivie de la cassette complète PAT + Cry1Ac du plasmide pMYC3006. Une délétion de 16 pb s'est produite dans le génome de la plante au site d'insertion.

Dans un cas comme dans l'autre, il n'a pas été mis en évidence de séquence du plasmide extérieure aux bordures de l'ADN-T.

Il n'y a, dans un cas comme dans l'autre, qu'une seule insertion comme le montre les analyses par hybridation de Southern, confirmées par les analyses de ségrégation au cours des générations de rétro-croisements et d'autofécondations. Les structures des inserts déduites de ces hybridations sont confirmées par la détermination complète des séquences d'ADN de ces inserts et des bordures constituées par le génome du cotonnier aux sites d'intégration.

Connaissant ces séquences aux quatre jonctions inserts-génome, la présence d'ORF potentiellement interrompues ou délétées par l'insertion a été recherchée dans les 6 phases de lecture.

Pour l'événement 281-24-236 trois ORF de 15, 8 et 64 acides aminés respectivement ont été mises en évidence. Pour l'événement 3006-210-23, deux ORF de 14 et 25 acides aminés ont été mises en évidence. Aucune de ces ORF n'est homologue à une séquence polypeptidique répertoriée dans les bases de données. Par ailleurs, la tétraploïdie du cotonnier cultivé rend peu probable l'extinction de fonction par mutagenèse par insertion.

La présence d'éventuelles protéines fusion au niveau de ces jonctions entre le génome de la plante et l'insert a été recherchée. Pour l'événement 281-24-236, une hypothétique ORF 7 de 57 aa possède une suite de 6 aa homologue à une protéine de soja qui a 40% d'identité avec un allergène de pollen de ray-grass. Pour l'événement 3006-210-23 une hypothétique ORF 4 de 17 aa possède une suite de 6 aa homologue à un allergène de pollen de *Carpinus betulus* et de *Corylus avellana*.

En ce qui concerne les inserts eux-mêmes, la version tronquée de la séquence de la protéine PAT associée à l'événement 281-24-236 est exprimée très faiblement au niveau transcriptionnel et est indétectable en western.

Les seules séquences fonctionnelles introduites sont donc les séquences des protéines Cry1F, Cry1Ac et PAT.

4. Evaluation des risques pour la santé publique :

Le présent dossier concerne l'importation et la transformation industrielle de graines de cotonniers issus de la lignée 281-24-236/3006-210-23. L'évaluation des risques pour la santé publique porte sur la manipulation et la consommation accidentelle des graines de coton génétiquement modifiées.

4-1. pertinence des protéines utilisées dans les études toxicologiques :

Cry1Ac :

La protéine Cry1Ac présente dans la plante est une forme tronquée d'environ 65 kDa, résultat de l'activité protéasique des cellules sur la protoxine synthétique qu'elles produisent. Une protéine équivalente est obtenue après digestion trypsique de la protoxine synthétique produite dans *Pseudomonas fluorescens* pour la réalisation des études toxicologiques.

Cette équivalence de la protéine Cry1Ac exprimée dans le cotonnier 3006-210-23 et dans *Pseudomonas fluorescens* est attestée par l'analyse des peptides après digestion trypsique par MALDI-TOF MS.

Cry1F :

La protéine Cry1F est également présente sous la forme tronquée d'environ 65 kDa résultat de l'activité protéasique des cellules sur la protoxine synthétique qu'elles produisent. Une bande mineure de 33 kDa environ est également détectée en western.

Une protéine équivalente est obtenue après digestion trypsique de la protoxine synthétique produite dans *Pseudomonas fluorescens* pour la réalisation des études toxicologiques. Elle diffère en séquence par quatre changements d'acides aminés en positions 604, 608, 624, 629.

Il est conclu à l'équivalence fonctionnelle des deux types de protéines, produites dans la plante ou dans la bactérie, sur la base des mesures d'activité biologique sur plusieurs espèces d'insectes : *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*.

La protéine de 33 kDa est un produit de dégradation de la protoxine, puisqu'il n'y a pas d'autre séquence codante partielle de la protéine Cry1F, comme l'attestent les contrôles moléculaires sur les séquences introduites.

PAT :

Une protéine équivalente à celle produite dans la plante (addition d'une séquence leader de 16 aa en N terminal et d'une étiquette en C terminal de 6 résidus histidine) est produite dans *E. Coli* pour les études toxicologiques.

4.2. expression des protéines d'intérêt

Les analyses par western sur des extraits de cotonniers transformés détectent la protéine PAT et les protéines Cry1Ac et Cry1F.

La protéine Cry1Ac est présente sous la forme tronquée d'environ 65 kDa, résultat de l'activité protéasique des cellules sur la protoxine synthétique qu'elles produisent. La recherche de glycosylation post-traductionnelle aboutit à une conclusion négative. La protéine est produite à raison de 0.3 à 3.5 µg/g de poids sec de feuilles suivant le stade de développement.

La protéine Cry1F est également présente sous la forme tronquée d'environ 65 kDa, résultat de l'activité protéasique des cellules sur la protoxine synthétique qu'elles produisent. Une bande mineure de 33 kDa environ, correspondant à un produit de dégradation de la protoxine, est également détectée en western. Elle est essentiellement exprimée dans la tige, les feuilles, le pollen et les grains.

La protéine PAT est produite en quantité très faible dans les cotonniers transgéniques, ce qui empêche toute purification de cette protéine.

Les concentrations en Cry1F, Cry1Ac et PAT, dans des graines du génotype cumulant les deux événements 281-24-236 et 3006-210-23, sont respectivement de 4.1, 0.57 et 0.54 µg/g.

4.3 toxicité des protéines d'intérêt et de l'OGM

Des études de toxicité aiguë des protéines Cry1F et Cry1Ac ont été menées sur souris avec les protéines isolées de bactéries. Aucune manifestation n'est signalée avec des doses de plus de 5000 mg de protéine par kg de poids corporel.

Il n'a pas été mis en évidence d'effets indésirables chez des poulets nourris régulièrement avec du tourteau de cotonnier et aucune différence significative n'a été observée en comparaison avec du tourteau classique. Le dossier reçu ne donne pas les détails de cette expérience de tolérance alimentaire.

Dans la mesure où l'évaluation des risques pour la santé ne porte que sur la manipulation et la consommation accidentelle des graines de coton, la Commission du génie biomoléculaire

considère que les études fournies sont satisfaisantes. La Commission ne serait en revanche pas en mesure de statuer sur les risques liés à une alimentation humaine ou animale en l'absence d'étude de toxicité subchronique.

4.4 analyse du risque allergénique

Cry1F, Cry1Ac et PAT n'ont aucune homologie de séquences avec des allergènes connus (comparaison avec plus de 2000 séquences de protéines). Par ailleurs ces protéines sont dégradées rapidement dans des tests de digestion gastrique : moins de 5 secondes pour PAT et moins d'une minute pour les autres. Ces résultats tendent à montrer une absence de risque d'une augmentation du potentiel allergène de ce coton génétiquement modifié.

4.5 équivalence en substance

L'analyse biochimique détaillée (acides aminés individuels, minéraux, carbohydrates, acides gras, tocophérols, métabolites antinutritionnels, gossypol...) des lignées de cotonnier transformées (événement 281-24-236, événement 3006-210-23, la réunion des deux événements)*et de lignées isogéniques " contrôle " ne révèle pas de différences significatives au niveau de la composition des feuilles, de la graine et des produits qui en sont extraits (tourteaux, huile) sauf dans le cas de la teneur en fibres totales, légèrement inférieur au contrôle pour la lignée réunissant les deux événements. Cependant cette différence reste dans les limites de la variation observée dans la littérature.

La Commission considère qu'il n'y a pas de différences imputables à la transformation génétique autres que celles recherchées.

5. Evaluation des risques pour l'environnement :

5.1 Dissémination potentielle des gènes par le pollen ou par les graines

En cas de dissémination involontaire dans l'environnement, il est très peu vraisemblable que des plants de cotonnier puissent s'établir dans les conditions climatiques européennes. En effet, la susceptibilité de la plante et des graines au froid, ainsi que l'absence de dormance chez les graines de cotonnier font que, même si une graine parvient à germer en dehors des conditions de culture, la probabilité que la plante s'établisse est pratiquement nulle en France.

D'autre part, le cotonnier ne montre pas d'attribut (production d'un grand nombre de graines, dormance, facilité de dispersion, multiplication végétative...) qui pourrait lui conférer le statut de mauvaise herbe ou d'espèce envahissante.

Le cotonnier tétraploïde (*Gossypium hirsutum*) est considéré comme une espèce largement autogame, même si l'hétérofécondation peut avoir lieu. Le taux d'hétérofécondation dépend de la nature et de la population des insectes pollinisateurs (principalement abeilles et bourdons). Cependant, les croisements naturels ne sont possibles qu'à l'intérieur de l'espèce *G. hirsutum* ou avec l'autre espèce tétraploïde *G. barbadense*. Tout croisement avec d'autres espèces de *Gossypium* ou avec d'autres Malvacées est impossible sans intervention humaine. De ce fait, des croisements ne pourraient avoir lieu qu'avec d'autres cotonniers cultivés. Parmi les membres de l'UE, seuls la Grèce et l'Espagne cultivent le cotonnier.

5.2 Evaluation d'éventuelles nouvelles caractéristiques de l'OGM

Il n'y a pas de raison de penser que les gènes transférés et exprimés dans des plantes issues de la lignée 281-24-236/3006-210-23 puissent changer les caractéristiques biologiques (pertinentes en Europe) du cotonnier, ni ne lui procurent un avantage compétitif par rapport à des cotonniers conventionnels. En effet, la transformation génétique a pour but

de rendre les cotonniers résistants à certains lépidoptères prédateurs ; ce ne sont pas les prédateurs qui constituent un facteur limitant la diffusion de l'espèce, mais ses caractéristiques biologiques. Même si des plantes issues de la lignée 281-24-236/3006-210-23 sont résistantes au glufosinate d'ammonium, elles restent sensibles aux autres herbicides, et peuvent être contrôlées par ceux-ci.

5.3 Sécurité pour les organismes non cibles

Les protéines Cry1F et Cry1Ac, d'origine microbienne ou des graines de plantes transformées ont été administrées à des organismes non-cibles comme *Hipodamia convergens*, *Nasonia vitripennis*, *Chrysoperla carnea*, *Eisenia foetida*, *Folsomia candida*, *Colinus virginianus*, *Daphna magna*, sans qu'un effet toxique aigu ou sub-chronique ait pu être observé.

Des études d'impact sur certains organismes non-cibles ont été conduites, et n'ont pas montré d'effet délétère. De plus, le taux d'expression des protéines dans les organes qui pourraient exposer les organismes non-cibles (en particulier : pollen, nectar, racines) est très faible par rapport à la DL₅₀ calculée pour les organismes non-cibles testés. Du fait que l'exposition potentielle des organismes cibles et non-cibles aux cotonniers transgéniques serait due à une exposition accidentelle limitée dans le temps de par la biologie de l'espèce, il est très peu vraisemblable que celle-ci ait un impact négatif.

6. Monitoring et surveillance générale

Compte tenu des conclusions de l'évaluation des risques, le pétitionnaire n'envisage pas de plan de monitoring spécifique. La Commission du génie biomoléculaire considère que cette proposition est en effet cohérente avec les conclusions de l'évaluation des risques.

En ce qui concerne la surveillance générale, une information de la filière et des autorités est proposée, y compris sur les données moléculaires permettant la détection du matériel transgénique. La Commission du génie biomoléculaire considère que la surveillance générale doit permettre de détecter les éventuelles dispersions accidentelles de graines de coton.

La description de la méthode de détection fait état de l'absence d'amplification pour l'un des échantillons, ce qui correspond à un « faux négatif », et met en doute la fiabilité de la méthode de détection.

7. Conclusions :

Dans l'état actuel des connaissances et sur la base des données figurant dans le dossier, la Commission du génie biomoléculaire considère que l'évaluation du risque environnemental lié à la mise sur le marché des graines de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23, telle que décrite dans le dossier C/NL/04/01, à savoir limitée à l'importation, le stockage et le transformation industrielle, permet de conclure à l'absence de risque pour l'environnement en France.

Dans l'état actuel des connaissances et sur la base des données figurant dans le dossier, la Commission du génie biomoléculaire considère que la dispersion accidentelle de graines de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23, dans le cadre de la mise sur le marché décrite dans le dossier C/NL/04/01, ne présente pas de risque pour la santé humaine et animale.

Il est rappelé que cette conclusion ne porte pas sur l'utilisation intentionnelle des graines de coton génétiquement modifié 281-24-236/3006-210-23 en alimentation humaine ou animale.

Par ailleurs, la Commission du génie biomoléculaire considère comme nécessaire de disposer d'un éclaircissement sur l'obtention d'un « faux-négatif » avec la méthode de détection, qui met en doute sa fiabilité.

Le Président

Marc FELLOUS

